

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DU GRADE DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
MARC-ANDRÉ LAURIN, B. Sc. (BIOCHIMIE)**

**IDENTIFICATION ET CLONAGE DE PROTÉINES RÉTINIENNES : LES
PHOSPHOLIPASES A2 SÉCRÉTÉES ET LES N-MYRISTOYLTRANSFÉRASES**

JANVIER 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Christian Salesse qui m'a pris sous son aile en m'accueillant dans son laboratoire et qui a eu confiance en mes capacités et qui renouvelle son vote de confiance en étant mon directeur pour mes études doctorales. Il a su me faire profiter de son expérience de chercheur en tenant toujours compte de mon opinion, de mes idées.

Je tiens à remercier également de Dr François Boucher qui m'a donné goût à la recherche par son enseignement et qui a toujours été là pour répondre à mes nombreuses questions... souvent par une autre question.

Je suis particulièrement reconnaissant à mes parents qui m'ont toujours supporté et encouragé dans mes études en montrant de l'intérêt pour ce que je faisais, même si je crois qu'ils n'ont pas toujours tout compris. Ils m'ont inculqué la notion de persévérance et de sacrifice, des qualités qui sont indispensables pour poursuivre une carrière en recherche.

Je voudrais enfin remercier les étudiants du labo, Caroline, Dominique, Éric, Philippe, Stéphanie C., Stéphanie P., Solange, Vicky, et aussi Danny avec qui j'ai eu des discussions enrichissantes tant d'un point de vue scientifique qu'humain.

RÉSUMÉ

La rétine est le tissu responsable de transformer les stimuli lumineux en signaux électriques interprétables sous forme d'image par le cerveau. Elle se compose de deux parties, la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Un des rôles de l'EPR est de phagocyter les segments externes des photorécepteurs (SEP) et de recycler les composantes encore utilisables vers le segment interne des photorécepteurs. Lorsque l'EPR ne peut pas remplir cette fonction, il s'en suit une dégénérescence des photorécepteurs. Notre équipe de recherche a déterminé que l'EPR humain et bovin exprime des enzymes appelées phospholipases A_2 (PLA_2) qui sont responsables de l'hydrolyse de la chaîne acyle en position *sn*-2 des phospholipides membranaires. Notre équipe de recherche a aussi démontré que ces PLA_2 étaient différentes de celles connues jusqu'à maintenant. Il a donc été postulé que ces nouvelles PLA_2 pourraient jouer un rôle important dans la fonction de l'EPR.

Le présent mémoire contient des évidences expérimentales démontrant par RT-PCR (transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne) quels types de PLA_2 sécrétées ($sPLA_2$) sont exprimées par les cellules de l'EPR. Cette technique nous a permis de déterminer que l'EPR exprime les $sPLA_2$ des groupes IIA et V ainsi qu'une $cPLA_2$ du groupe IVC. De plus, les résultats suggèrent qu'une de ces $sPLA_2$ correspond à une isoforme qui pourrait être exprimée spécifiquement par l'EPR. Deux hypothèses ont été soulevées pour attribuer un rôle à ces $sPLA_2$ dans la phagocytose des SEP par l'EPR.

La rétine est un tissu particulier par les phénomènes dont elle est le siège ainsi que par les protéines qui y sont spécifiquement exprimées. Les protéines impliquées

dans la phototransduction comme la rhodopsine, la transducine et la recoverine représentent de bons exemples. Ces protéines sont associées à la membrane soit de façon transmembranaire pour la rhodopsine ou par N-acylation dans le cas de la recoverine et de la transducine. La N-acylation dans la rétine est différente par rapport aux autres tissus. En effet, le phénomène de N-acylation dans le reste de l'organisme est homogène, c'est-à-dire que les protéines acylées dans les tissus autres que la rétine sont uniquement N-acylées avec l'acide myristique. Par contre, dans la rétine, on retrouve plusieurs types de chaînes acyles en position N-terminale des protéines et le type majoritaire n'est pas le myristate. Les enzymes responsables de cette acylation ont été nommées N-myristoyltransférases (NMT) puisqu'elles ne transféraient que des myristates sur les protéines des tissus où elles ont d'abord été isolées.

La deuxième partie de ce mémoire se consacre donc à la détermination par RT-PCR des types de NMT présents dans la rétine. La présence d'un type différent de NMT dans la rétine pourrait expliquer l'hétéroacylation des protéines rétiniennes, cette possibilité n'ayant pas encore été évaluée dans la littérature. Par contre, le clonage et le séquençage des ADNc de ces NMT ne nous permettent pas de croire que ces enzymes sont différentes des autres NMT connues. Par ailleurs, la technique du RT-PCR ne nous a pas permis d'identifier et de quantifier les différentes isoformes des NMT qui pourraient être présentes dans la rétine.

CONTRIBUTION DE CHACUN DES AUTEURS DES ARTICLES PRÉSENTÉS DANS CE MÉMOIRE

Étant donné que ce mémoire est rédigé sous forme d'articles, il importe de mentionner la contribution de chacun des auteurs à l'expérimentation et à la rédaction de ces articles.

Pour le premier article intitulé « *Cloning of the phospholipases A₂ expressed by the human retinal pigment epithelium* », j'ai rédigé le manuscrit dans son entier sauf en ce qui a trait à l'introduction sur les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂). J'ai réalisé toutes les expérimentations RT-PCR concernant les sPLA₂ alors que Vicky Beaudoin a effectué les expérimentations concernant les cPLA₂.

J'ai réalisé toutes les mesures expérimentales du deuxième article intitulé « *Evidence for the expression of N-myristoyltransferases in Human Retinal Tissues* », de même que la rédaction de toutes les sections de cet article sauf l'introduction qui a été écrite par Dominique Verreault.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	i
Résumé	ii
Contribution de chacun des auteurs des articles présentés dans ce mémoire.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Structure de l'œil	2
1.2 Organisation de la rétine	4
1.3 Fonction des cellules de la rétine.....	4
1.3.1 Les photorécepteurs.....	4
1.4 L'épithélium pigmentaire rétinien	10
1.4.1 La morphologie de l'EPR	10
1.4.2 Les fonctions de l'EPR	13
1.5 La dégénérescence maculaire liée à l'âge	16
1.6 Les phospholipases A ₂	18
1.6.1 Les phospholipases A ₂ cytosoliques	21
1.6.2 Les phospholipases A ₂ calcium indépendantes	22
1.6.3 Les acétylhydrolases des facteurs d'agrégation plaquettaire	23
1.6.4 Les phospholipases A ₂ sécrétées	24
1.7 Acylation des protéines	29

1.7.1. La N-myristoylation	30
1.7.2 Hétéroacylation des protéines rétinienne	32
1.7.3 N-myristoylation des phospholipases A ₂	33
1.8 Objectifs du travail de recherche décrit dans ce mémoire.....	33
1.8.1 Objectifs pour les sPLA ₂	34
1.8.2 Objectifs pour les NMT	35

CHAPITRE 2 : TENTATIVES DE PURIFICATION DES sPLA₂ DES CELLULES D'EPR EN CULTURE

2.1 Hypothèse de départ	37
2.2 Matériel et Méthodes.	40
2.2.1 Matériel	40
2.2.2 Détermination de l'activité PLA ₂	40
2.2.3 Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄	41
2.2.4 Chromatographie sur échangeuse de cations	45
2.2.5 Chromatographie à interactions hydrophobes	45
2.2.6 Chromatographie d'affinité	46
2.2.7 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western.	47
2.3 Résultats et Discussion	48
2.3.1. Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄	49
2.3.2 Chromatographie sur échangeuse de cations	52
2.3.3 Chromatographie d'interactions hydrophobes	56
2.3.4 Chromatographie d'affinité	57
2.4 Discussion générale sur les purifications	65

CHAPITRE 3 : CLONING OF THE PHOSPHOLIPASES A₂

EXPRESSED BY THE HUMAN RETINAL PIGMENT

EPITHELIUM

3.1 Abstract	69
3.2 Introduction	69
3.3 Methods	71
2.3.1 Extraction of RNA from RPE cells and amplification of different PLA ₂ s	72
2.3.2 Cloning of human RPE PLA ₂ s	72
3.4 Results	73
3.5 Discussion	74
3.6 Acknowledgements	76
3.7 References	77
3.8 Tables and figures	82
3.9 Annexes.....	83

CHAPITRE 4 : EVIDENCE FOR THE EXPRESSION OF N-

MYRISTOYLTRANSFERASES IN HUMAN RETINAL TISSUES

4.1 Summary	89
4.2 Introduction	89
4.3 Materials and Methods	91
4.3.1 RNA extraction from retinal tissues	91
4.3.2 RT-PCR	91
4.3.3 Cloning and sequencing of the PCR products	92
4.4 Results	93
4.5 Discussion	94

4.6 Acknowledgements	95
4.7 References	95
4.8 Tables and figures	100
4.9 Annexes.....	103

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

5.1 Récapitulation des résultats pour les phospholipases A_2	110
5.2 Perspectives de recherche pour les sPLA ₂	114
5.3 Récapitulation des résultats pour les NMT	116
5.4 Perspectives de recherche pour les NMT	117

CHAPITRE 6 BIBLIOGRAPHIE	120
---------------------------------------	------------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Caractéristiques des phospholipases A ₂ sécrétées	26
Tableau 2.1	Tableau de précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄	44
Tableau 2.2	Activité spécifique des différentes fractions de précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄	50
Tableau 2.3	Activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie sur échangeuse de cations à partir du milieu de culture des cellules d'EPR humain.	53
Tableau 2.4	Activité PLA ₂ spécifique des différentes fractions de la chromatographie à interactions hydrophobes à partir du milieu de culture des cellules d'EPR humain.....	58
Tableau 2.5	Activité spécifique des différentes fractions de chromatographie d'affinité à partir du milieu de culture des cellules d'EPR humain	62
Table 3.1.	Primers used to amplify different types of PLA ₂ expressed by RPE cells	54
Table 4.1	Primers used for the screening of the expression of NMTs by RPE and retina	100
Tableau 5.1	Comparaison entre les propriétés biochimiques des sPLA ₂ , cPLA ₂ , iPLA ₂ et les PLA ₂ des cellules d'EPR humain et bovin	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure de l'œil	3
Figure 1.2	Organisation de la rétine	5
Figure 1.3	Structure d'un photorécepteur.....	7
Figure 1.4	Mécanisme de la phototransduction visuelle	9
Figure 1.5	Structure d'une cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien	11
Figure 1.6	Microscopie électronique de l'épithélium pigmentaire rétinien	12
Figure 1.7	Photoisomérisation du 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal.	14
Figure 1.8	Mécanisme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR.	15
Figure 1.9	Activité phospholipase A ₂ ainsi que les sites d'hydrolyse des phospholipides par d'autres types de phospholipases	19
Figure 1.10	Isoformes de la NMT-1	31
Figure 2.1	Résultats d'immunobuvardage de type Western.....	38
Figure 2.2	Comparaison de la structure primaire des sPLA ₂ du groupe IB et du groupe IIA.....	39
Figure 2.3	Exemple de cinétique enzymatique utilisée lors du dosage des sPLA ₂ des fractions d'élution de la chromatographie à interactions hydrophobes.....	42
Figure 2.4	Courbe d'étalonnage de la fluorescence de l'acide 10-pyrène décanoïque en fonction de sa concentration.....	43
Figure 2.5	Précipitation des sPLA ₂ du milieu de culture d'EPR humain.....	51
Figure 2.6	Profil d'élution des sPLA ₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie sur échangeuse de cations.	54

Figure 2.7	Immunobuvardage de type Western de la fraction 8 de la chromatographie sur échangeuse de cations.....	55
Figure 2.8	Profil d'élution des sPLA ₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie d'interactions hydrophobes.	59
Figure 2.9	Immunobuvardage de type Western des fractions purifiées par chromatographie à interactions hydrophobes.....	60
Figure 2.10	Profil d'élution des sPLA ₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie d'affinité.....	63
Figure 2.11	Électrophorèse (A) et immunobuvardage de type Western (B) avec les fractions obtenues lors de la chromatographie d'affinité.....	64
Figure 3.1	Migration of PCR products of PLA ₂ s present in RPE	55
Figure 3.2	Contrôles positifs des différentes amorces de sPLA ₂	84
Figure 3.3	Séquencage du clone du produit PCR de la sPLA ₂ du groupe IIA	85
Figure 3.4.	Séquencage du clone du produit PCR de la sPLA ₂ du groupe V.....	86
Figure. 4.1	Migration of PCR products of NMTs present in RPE and retina using the first set of primers	101
Figure. 4.2	Migration of PCR products of NMTs present in the retina using the second set of primers	102
Figure 4.3.	Séquencage du clone du produit PCR de NMT1 entier.....	105
Figure 4.4	Séquencage du clone du produit PCR de NMT2 entier.....	108

LISTE DES ABRÉVIATIONS

10-PyPM	1-hexadécanoyl-2-(1-pyrènedécanoyl)- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphométhanol
sPLA ₂	Phospholipase A ₂ sécrétée
AA	Acide arachidonique
<i>p</i> BPB	Bromure de parabromophénol
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DO ₂₈₀	Absorbance à 280 nm
DTT	Dithiothréitol
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
iPLA ₂	Phospholipase A ₂ calcium indépendante
MWCO	Molecular weight cutoff
NMT	N-myristoyltransférase
PAF-AH	Acétylhydrolase des facteurs d'agrégation plaquettaire
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylsérine
RT-PCR	Transcription inverse suivi d'une réaction de polymérase en chaîne
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis
SEP	Segment externe des photorécepteurs

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Structure de l'œil

L'œil est l'organe responsable de la perception visuelle. Il possède une structure complexe témoignant d'un merveilleux agencement entre un système optique qui transforme l'image et des capteurs nerveux très sensibles qu'on appelle photorécepteurs. Ces cellules nerveuses spécialisées comportent une machinerie métabolique complexe leur permettant de transformer les stimuli lumineux qu'elles reçoivent en signaux électriques transmis au cerveau via le nerf optique où ils seront transformés en images.

L'œil est composé des tuniques fibreuse, vasculaire et interne [1, 2]. Comme on peut le voir à la Figure 1.1, la tunique fibreuse est constituée de la sclère et de la cornée. La sclère, qui couvre 80% de la partie postérieure du globe oculaire, se compose de tissu conjonctif dense et permet de maintenir la forme du globe oculaire et de protéger les tissus internes. Contrairement à la sclère qui est opaque, la cornée est transparente, ce qui permet de laisser passer la lumière. La tunique vasculaire est composée de trois tissus : le corps ciliaire, l'iris et la choroïde. Le corps ciliaire est composé de muscles lisses et sert à la contraction et à la dilatation du cristallin qui représente la lentille de l'œil. L'iris, qui est responsable de la couleur de l'œil, sert de diaphragme et peut ainsi moduler la quantité de lumière qui pénètre à l'intérieur de l'œil. La choroïde est largement vascularisée et sert de tissu nourricier à la troisième tunique de l'œil appelée rétine.

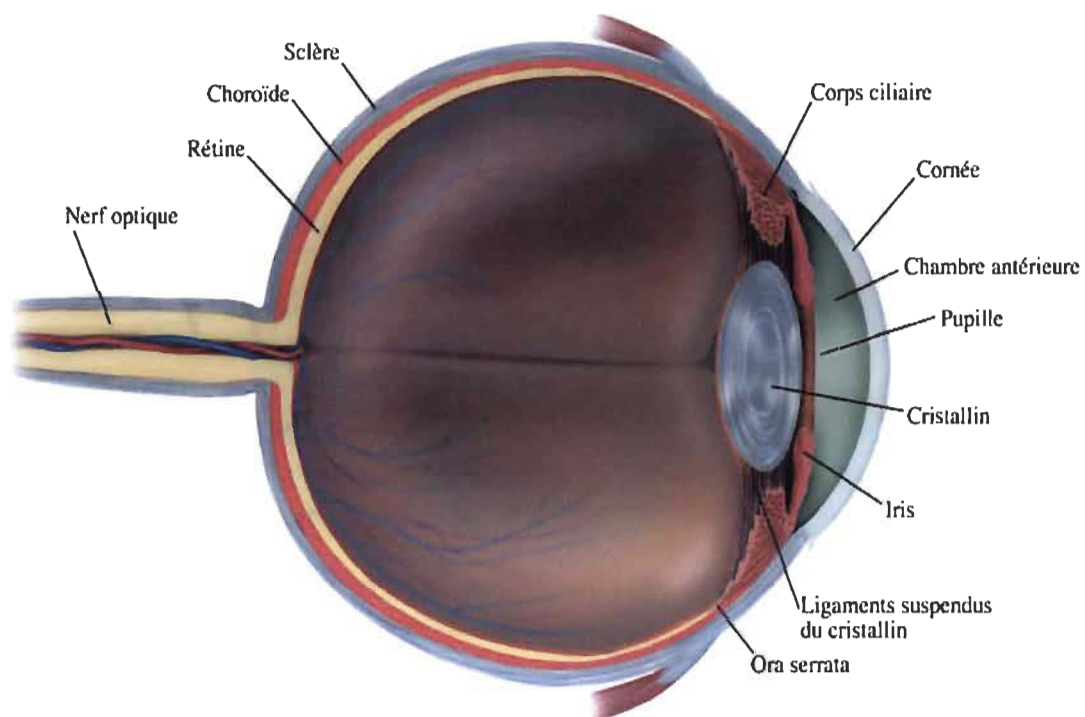


FIGURE 1.1 : Structure de l'œil (tirée d'une table anatomique de la compagnie Papertech, 1999).

1.2 Organisation de la rétine

La rétine se compose principalement de deux parties intimement reliées entre elles. La première est l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dont la face basale est accolée à la membrane de Bruch et la face apicale à la rétine neurale (Figure 1.2). La rétine neurale se compose des cellules de Müller, qui la traversent sur toute son épaisseur, et de cellules nerveuses bipolaire, amacrine et ganglionnaire. La rétine neurale contient aussi les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) dont les segments externes sont étroitement associés à l'EPR (Figure 1.2). Les cellules neuronales sont responsables d'acheminer le signal nerveux vers le nerf optique. Les cellules de Müller sont des cellules gliales responsables du soutien des cellules neuronales ainsi que du transport de nutriments vers ces cellules.

1.3 Fonction des cellules de la rétine

La rétine est composée de différents types cellulaires qui jouent chacun un rôle précis dans le bon fonctionnement du processus visuel.

1.3.1 Les photorécepteurs

Les photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes, sont responsables de la transduction des stimuli lumineux en signaux électriques, ce que nous appelons, la phototransduction. Les cônes sont responsables de la vision des couleurs nécessitant une grande intensité

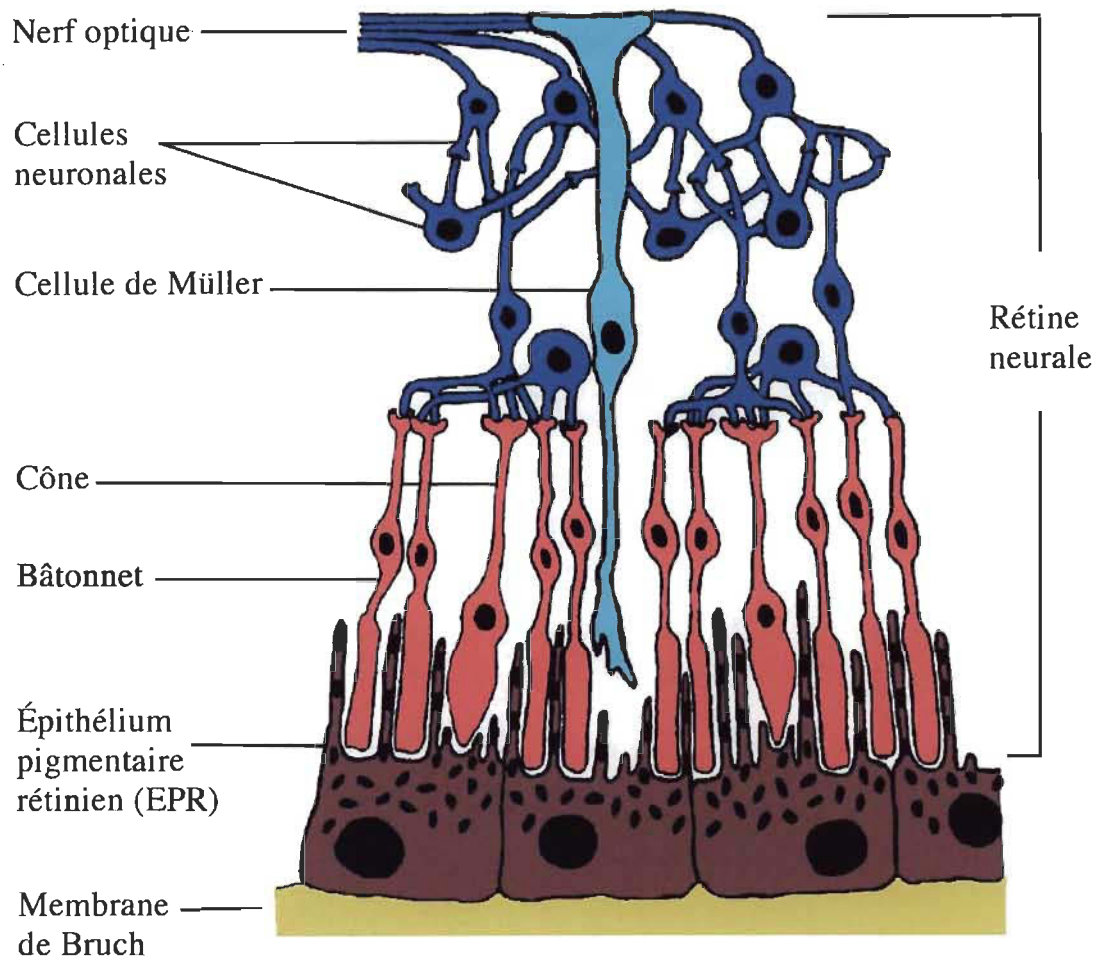


FIGURE 1.2 Organisation de la rétine.

lumineuse (vision photopique) alors que les bâtonnets captent la lumière de faible intensité (vision scotopique) [1, 3, 4].

Ces cellules sont structurellement et fonctionnellement polarisées [3, 5-7]. Les photorécepteurs sont composés de quatre parties possédant des fonctions distinctes : le segment externe (SEP), le segment interne, le noyau et la terminaison synaptique (Figure 1.3). Le segment interne comprend les organites cellulaires de même que toute la machinerie métabolique. Le noyau contient le matériel génétique. La terminaison synaptique sert à transmettre, par le biais de neurotransmetteurs, le signal électrique provenant de la phototransduction. Le segment externe est formé d'un empilement de disques membranaires qui sont composés de 50 % de phospholipides et de 50 % de protéines (en poids sec) [3]. La protéine clef de ce système, la rhodopsine, est responsable de capter les photons. Elle constitue 85 % des protéines totales [8] et 95 % des protéines membranaires des disques des photorécepteurs [9]. Elle se compose de l'opsine et du 11-*cis*-rétinal. Lorsqu'un photon est absorbé par la rhodopsine, il se produit une isomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal, ce qui crée un changement de conformation de la rhodopsine et qui active la sous-unité α de la transducine ($T\alpha$) qui capte un GTP et se dissocie des sous-unités $\beta\gamma$ de la transducine ($T\beta\gamma$). La $T\alpha$ portant un GTP se lie à la phosphodiesterase ($PDE\alpha\beta\gamma$), ce qui permet l'hydrolyse du GMPc en 5'-GMP. Cette baisse de GMPc ferme le canal K^+/Ca^{2+} , ce qui provoque une baisse de la concentration en calcium étant donné que l'échangeur Na^+ , K^+/Ca^{2+} continue de fonctionner. Cette baisse de calcium active les protéines activatrices de la guanylate cyclase (GCAP) qui se lient à la guanylate cyclase qui synthétisera du GMPc. Le GMPc servira à réouvrir les canaux calciques, ce qui aura comme conséquence l'entrée du calcium dans la cellule. Cette hausse de calcium provoquera un

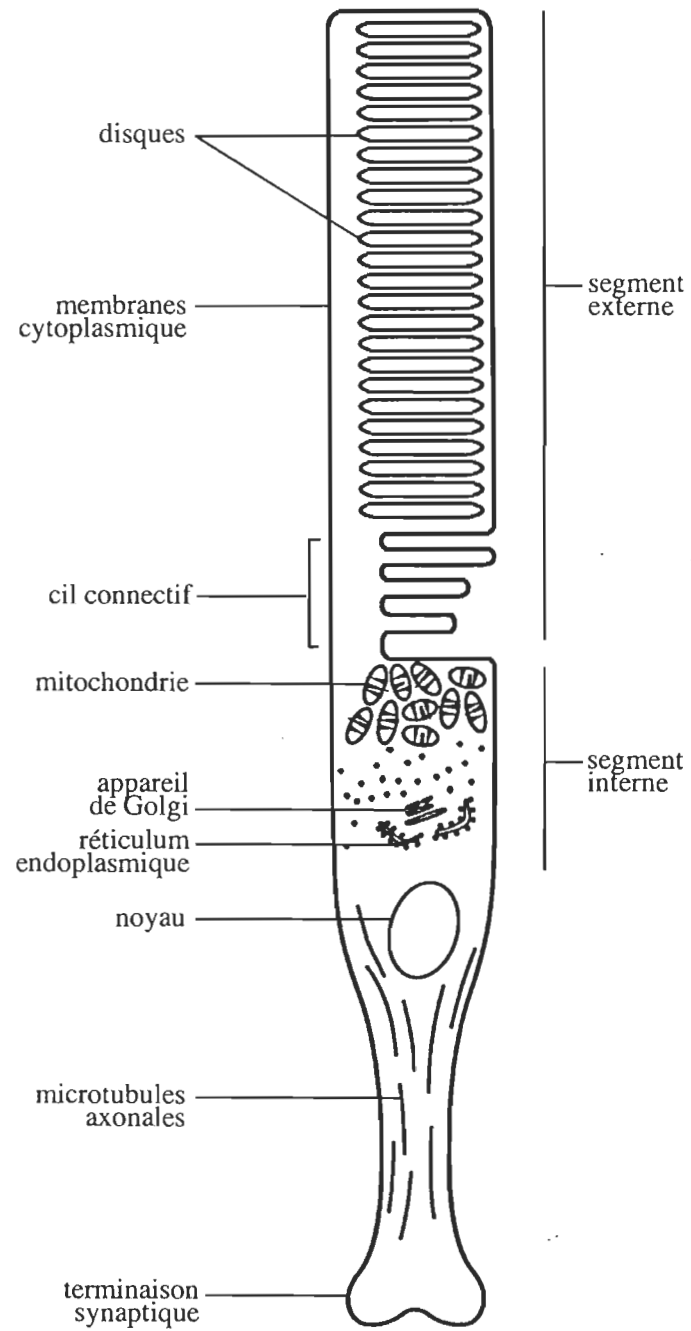


FIGURE 1.3 Structure d'un photorécepteur (adaptée de [10]).

changement conformationnel de la recoverine qui lui permettra d'inhiber la rhodopsine kinase (Figure 1.4) (pour revue sur la phototransduction, voir [11]). Il est intéressant de mentionner que la $T\alpha$, les GCAP et la recoverine sont des protéines hétéroacylées comme on le verra à la section 1.7.

Les phospholipides qui constituent les membranes des disques des segments externes des photorécepteurs sont principalement composés d'acides gras polyinsaturés, entre autres l'acide docosahexaénoïque (22:6 ω 3) qui compte pour plus de 50 % de ces acides gras [12]. Ces acides gras sont particulièrement sensibles à la peroxydation [13] puisque la rétine est le tissu le plus oxygéné du corps humain [14]. La peroxydation lipidique est reconnue pour entraîner des changements des propriétés physiques des membranes [15, 16]. En effet, la peroxydation diminue l'hydrophobicité des chaînes grasses et augmente l'espace occupé par celles-ci dans la membrane. Ceci entraîne une augmentation de l'anisotropie, de la microviscosité et de l'hétérogénéité des phospholipides membranaires [15, 16], ce qui influence la fluidité membranaire [17]. L'activité de certaines protéines est sensible à la peroxydation des lipides membranaires. Le cytochrome P-450 du réticulum endoplasmique [18] et les enzymes impliqués dans le transport ionique en sont des exemples, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire [19].

Le « vieillissement » de la rhodopsine [21] et la peroxydation des phospholipides insaturés des membranes discales des photorécepteurs nécessitent une production constante de disques par les photorécepteurs. Ces disques sont produits dans la portion basale et migrent vers la portion apicale où ils seront phagocytés par l'EPR [22].

Il est essentiel qu'un équilibre s'installe entre la production de disques et la phagocytose des SEP puisque les éléments phagocytés par l'EPR, entre autres le rétinol et les phospholipides [23], sont retournés aux photorécepteurs pour la production de nouveaux disques.

1.4 L'épithélium pigmentaire rétinien

1.4.1 La morphologie de l'EPR

L'épithélium pigmentaire rétinien est composé d'une monocouche de cellules dont la face basale est en contact avec la choroïde et la face apicale avec la rétine neurale (Figure 1.1). La membrane apicale de l'EPR est constituée de deux types de microvillosités qui s'allongent entre les photorécepteurs [24] (Figures 1.5 et 1.6). Le premier type est long de 5 à 7 μm et n'entre pas en contact avec les photorécepteurs. Par contre, un autre type de microvilli, plus petit (3 à 4 μm), est étroitement associé au SEP et entoure leur portion apicale. De cette façon, une cellule d'EPR est en contact avec 30 à 50 photorécepteurs [25]. La membrane basale des cellules de l'EPR repose sur la lame basale de l'EPR [24]. Les cellules de l'EPR sont morphologiquement et fonctionnellement polarisées. Les organites qui les composent ne sont pas disposés de façon homogène entre les faces apicale et basale [27, 28]. On peut voir à la Figure 1.5 que les mélanosomes, organites contenant les pigments de mélanine, sont surtout concentrés dans la portion apicale des cellules d'EPR. La mélanine joue deux fonctions dans l'EPR. Dans un premier temps, elle capte l'excédent de rayons lumineux afin

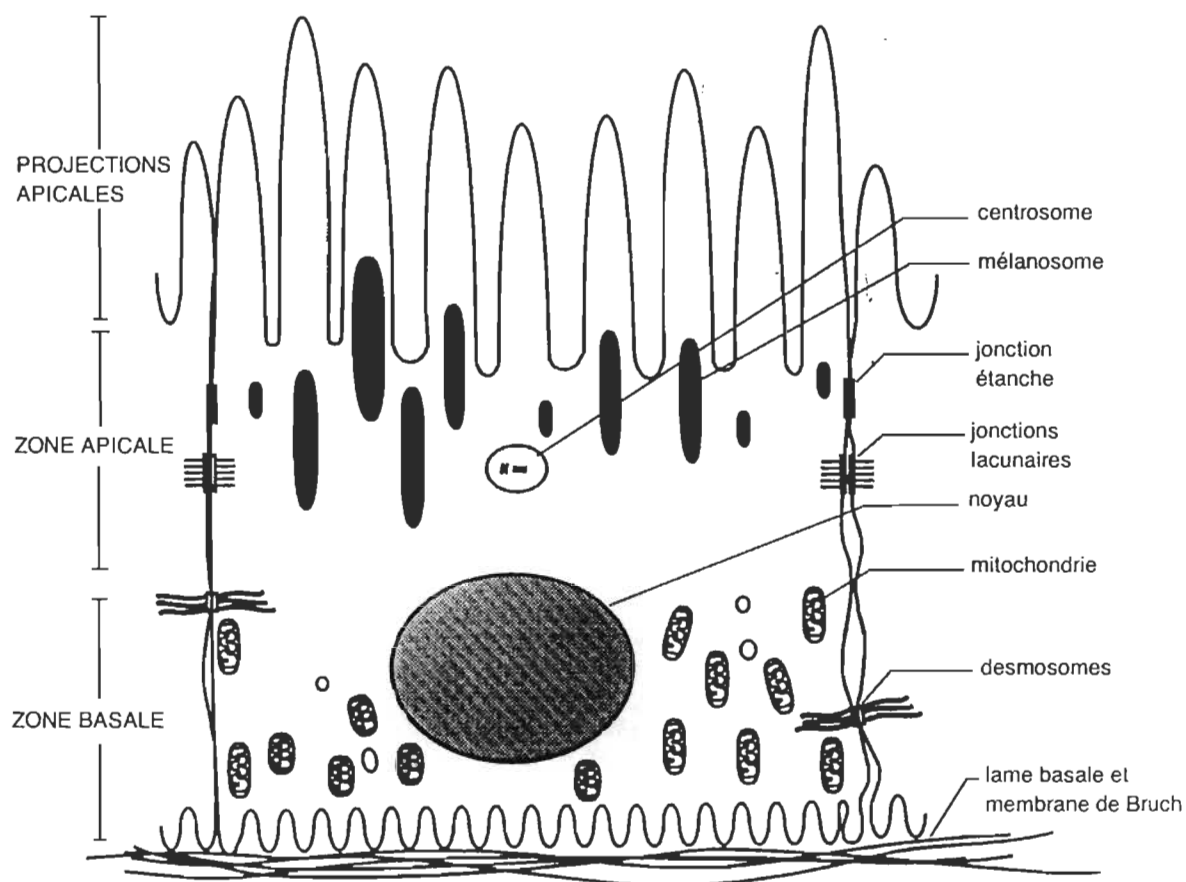


FIGURE 1.5 Structure d'une cellule de l'épithélium pigmentaire rétinien (tirée de [26]).

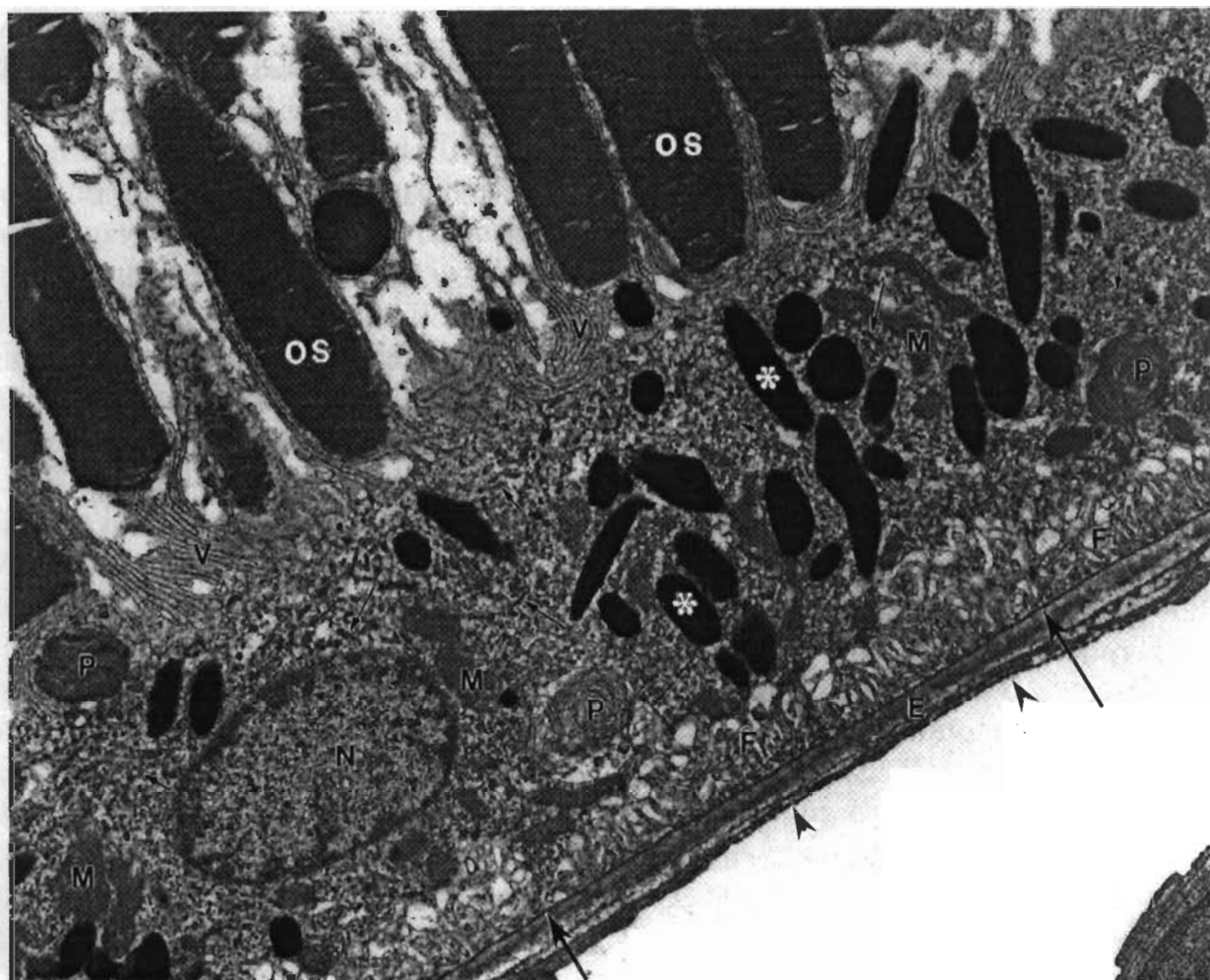


FIGURE 1.6 Microscopie électronique de l'épithélium pigmentaire rétinien. (N), noyau ; (F), replis de la zone basale ; (V), microvillosités ; (M), mitochondries ; (P), phagosomes ; (OS), segments externes des photorécepteurs ; (E) membrane de Bruch ; (*) mélanosomes ; flèches larges, membrane basale de l'EPR ; pointes de flèches, capillaires de la choroïde ; flèches minces et courtes, réticulum endoplasmique lisse ; flèches minces et longues, réticulum endoplasmique rugueux. Agrandissement : 13200 X (tirée de [26]).

d'éliminer la réflexion de la lumière dans le fond de l'œil pour que l'image soit parfaitement claire [29]. Elle joue aussi un rôle d'antioxydant en captant les radicaux libres (oxygène singulet), ce qui empêche l'oxydation des composantes de l'EPR [30]. D'autres composantes de l'EPR sont aussi distribuées de façon asymétrique, comme le noyau et les mitochondries qui se situent dans la portion basale des cellules de l'EPR [31]. Les cellules d'EPR sont liées entre elles par des jonctions étanches et des jonctions lacunaires [32]. Les jonctions lacunaires permettent l'échange de petites molécules, comme les nutriments et les métabolites, entre cellules voisines. Les jonctions étanches permettent de former une barrière imperméable (barrière hémato-oculaire) entre la choroïde et la rétine neurale. Cette barrière permet de contrôler la quantité et le type de nutriment provenant des vaisseaux sanguins de la choroïde vers les photorécepteurs.

1.4.2 Les fonctions de l'EPR

L'EPR est un tissu qui joue des rôles primordiaux dans la fonction oculaire. Premièrement, il participe à la barrière hémato-oculaire en régulant les échanges entre la choroïde et la rétine neurale et en servant de réservoir pour certaines molécules essentielles à la fonction visuelle, comme le rétinol. Deuxièmement, l'EPR participe au cycle visuel (cycle du rétinol) c'est-à-dire au stockage et au métabolisme de la vitamine A (rétinol). En effet, lors de l'absorption de la lumière par la rhodopsine, le 11-*cis*-rétinol est isomérisé en tout-*trans*-rétinol (Figure 1.7) dans les disques des photorécepteurs visuels. Le rétinol se dissocie de la rhodopsine et est acheminé par un réseau de transporteurs vers l'EPR où il sera réisomérisé en 11-*cis*-rétinol et retourné au SEP afin de régénérer la rhodopsine [33]. Troisièmement, l'absorption intraoculaire, par la mélanine, des rayons lumineux épars est une autre fonction très importante de l'EPR

puisque, sans cette propriété, les rayons lumineux seraient réfléchis à l'intérieur du globe oculaire, ce qui dégraderait grandement l'image perçue. Quatrièmement, les cellules de l'EPR ont aussi la fonction de phagocyter la portion distale des SEP et de digérer les composantes cellulaires pour les recycler vers les photorécepteurs. Le mécanisme de phagocytose des SEP par l'EPR s'opère en cinq étapes [34] comme on peut le voir à la Figure 1.8 : 1) Les SEP sont attachés, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, aux cellules de l'EPR; 2) L'élongation des pseudopodes des cellules d'EPR qui vont ensuite entourer les SEP; 3) Il y a ensuite fusion entre la membrane des SEP et les pseudopodes de l'EPR qui mènera à 4) une internalisation des phagosomes et 5) à leur migration à l'intérieur des cellules d'EPR où ils fusionneront à des lysosomes pour former les phagolysosomes pour ensuite être hydrolysés. Il a été démontré qu'une altération de la fonction phagocytaire ou de la fonction digestive de l'EPR peut mener à des conséquences pathologiques importantes comme les dégénérescences rétinienne dont fait partie la dégénérescence maculaire liée à l'âge [35].

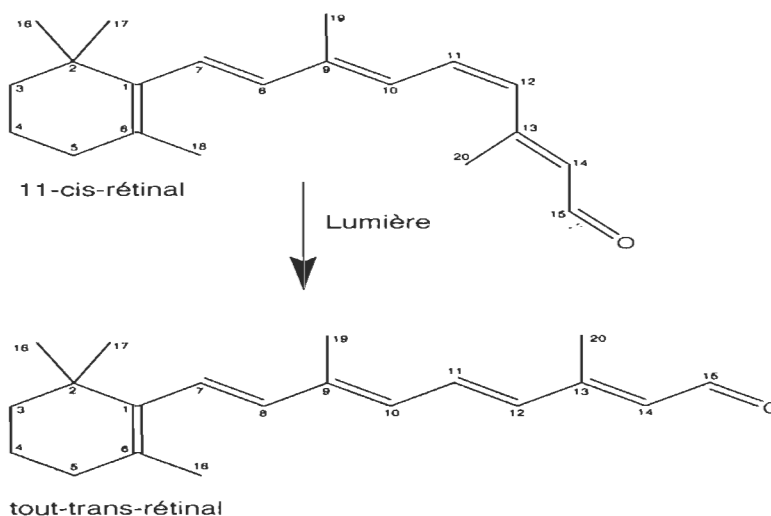


FIGURE 1.7 Photoisomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal.

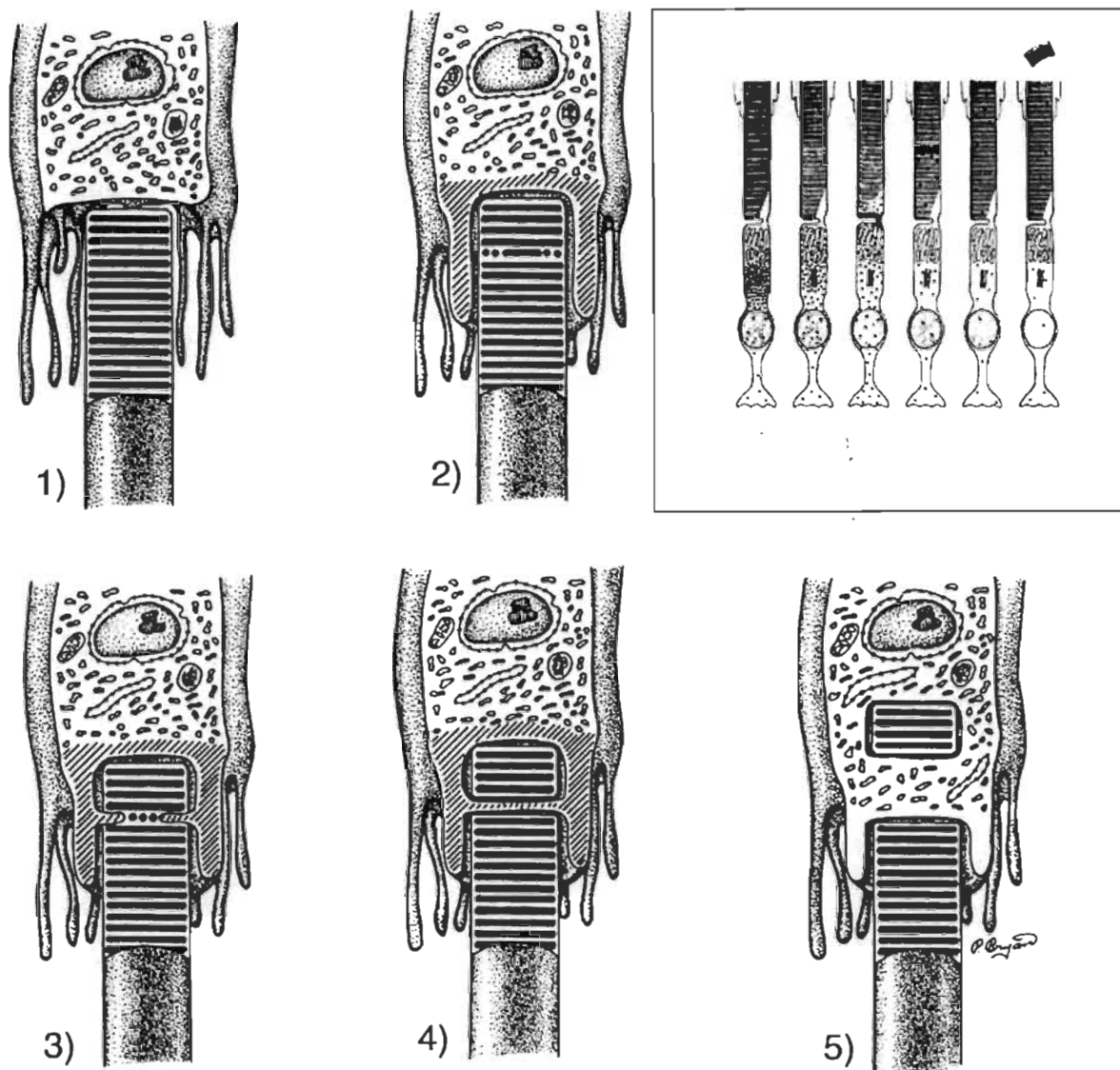


FIGURE 1.8 Mécanisme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR. (1-2) Formation de pseudopodes qui entourent l'extrémité du SEP; (3-4) Fusion des membranes de l'EPR et du SEP et formation d'un phagosome; (5) Migration du phagosome vers les lysosomes cellulaires. En encart, on peut voir la migration de protéines marquées radioactivement dans les disques des photorécepteurs (tirée de [36]).

1.5 La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie, comme son nom l'indique, qui touche surtout les personnes âgées. C'est la cause de cécité la plus importante chez les adultes de plus de 50 ans [37, 38]. La DMLA touche plus de 8,5 millions d'américains de plus de 40 ans [39] et 10 à 25 % des individus de plus de 80 ans en sont atteints [40]. Les symptômes apparaissent souvent après 50 ans et consistent en une dégradation du champ visuel central et touche graduellement le champ visuel périphérique pour mener le plus souvent à une cécité complète vers 70 à 80 ans [41].

Cette maladie attaque les deux yeux en même temps bien que la perte visuelle peut varier d'un œil à l'autre [42]. La DMLA semble posséder des causes génétiques puisque l'incidence de développer la maladie chez les parents de gens affectés est plus grande que chez les autres individus [43]. De plus, il existe une grande concordance pour la DMLA entre des jumeaux identiques [44]. La DMLA est causée principalement par l'accumulation de dépôts lipidiques sur et sous la membrane basale de l'EPR [45], ce qui mène à l'apparition de druses, à l'atrophie des cellules de l'EPR et des capillaires de la choroïde. Il s'en suit un détachement de l'EPR, une néo-vascularisation de la choroïde [46] et une dégénérescence des photorécepteurs, ce qui mène à la cécité. Chez l'individu sain, il y a une accumulation progressive de débris membranaires entre la membrane de Bruch et la lame basale de l'EPR. Une accumulation similaire entre les cellules d'EPR et la membrane basale apparaîtra chez la majorité des individus à partir de la cinquantaine et s'accélérera très rapidement chez les individus atteints de DMLA vers la soixantaine [47, 48].

La composition de ces dépôts lipidiques, appelés druses, est encore mal connue et varie d'une personne à l'autre. On sait cependant qu'ils sont constitués majoritairement de lipides neutres et de phospholipides (50 % de phosphatidylcholine (PC), 30 % de phosphatidyléthanolamine (PE) et 20 % de phosphatidylinositol (PI) et de phosphatidylsérine (PS)) [48]. Il y a deux types de druses, celles dites dures et celles dites molles. Les druses dures sont principalement composées de phospholipides [47]. Elles sont très communes chez les personnes âgées et peuvent aussi se former chez des personnes plus jeunes. Elles sont petites (moins de 64 μm de diamètre), rondes, jaunes et bien définies. Elles ont tendance à s'agréger et peuvent être un signe précurseur d'une atrophie de l'EPR mais leur présence ne mène pas nécessairement à la DMLA [49]. Les druses molles sont plus grosses (plus de 64 μm de diamètre), jaunes pâles et beaucoup moins bien définies que les druses dures. Elles apparaissent très rarement avant l'âge de 65 ans [50]. Elles sont souvent formées par l'agrégation de druses dures et contiennent des lipides neutres [47] ainsi que des débris membranaires, entre autres des phospholipides et du collagène [51, 52]. Les druses molles sont un signe précurseur de la DMLA [53].

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement ni de méthode fiable de diagnostiquer de façon précoce la maladie puisqu'il semble que plusieurs protéines pourraient être responsables de cette pathologie. En effet, plusieurs gènes jusqu'à maintenant ont été associés à la DMLA. Ceux-ci n'expliquent cependant qu'une partie des cas de DMLA. Il devrait donc exister plusieurs autres gènes responsables de l'apparition de la DMLA. Cette pathologie étant causée par l'accumulation de lipides, de part et d'autre de la membrane basale de l'EPR, leur accumulation pourrait être due à un problème dans l'expression de lipases telles que les phospholipases A_2 décrites dans ce mémoire.

1.6 Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) (EC 3.1.1.4) font partie d'une grande famille d'enzymes qui hydrolysent l'acide gras situé en position *sn*-2 du groupement glycérol des phospholipides membranaires [54] pour former un acide gras et un lysophospholipide (voir Figure 1.9). Les premières études sur les PLA₂ ont d'abord été phénoménologiques et portaient sur les venins de cobra [55, 56]. Par la suite, on a trouvé des enzymes similaires en grande quantité dans le pancréas porcin ainsi que dans le venin de plusieurs espèces de serpents et d'abeilles, ce qui a permis l'étude de leur mécanisme d'action et de leur structure [57].

Depuis ce temps, beaucoup d'autres types de PLA₂ ont été découvertes et caractérisées. Les PLA₂ remplissent plusieurs fonctions physiologiques et métaboliques. Par exemple, la libération d'acides gras comme l'acide arachidonique (AA) et l'acide oléique peuvent servir comme source énergétique [58]. L'AA est aussi un messenger secondaire [59, 60] et un précurseur des eicosanoïdes qui sont des médiateurs puissants de la réponse inflammatoire [61-63]. Les lysophospholipides libérés lors de l'hydrolyse des phospholipides sont aussi importants dans la signalisation

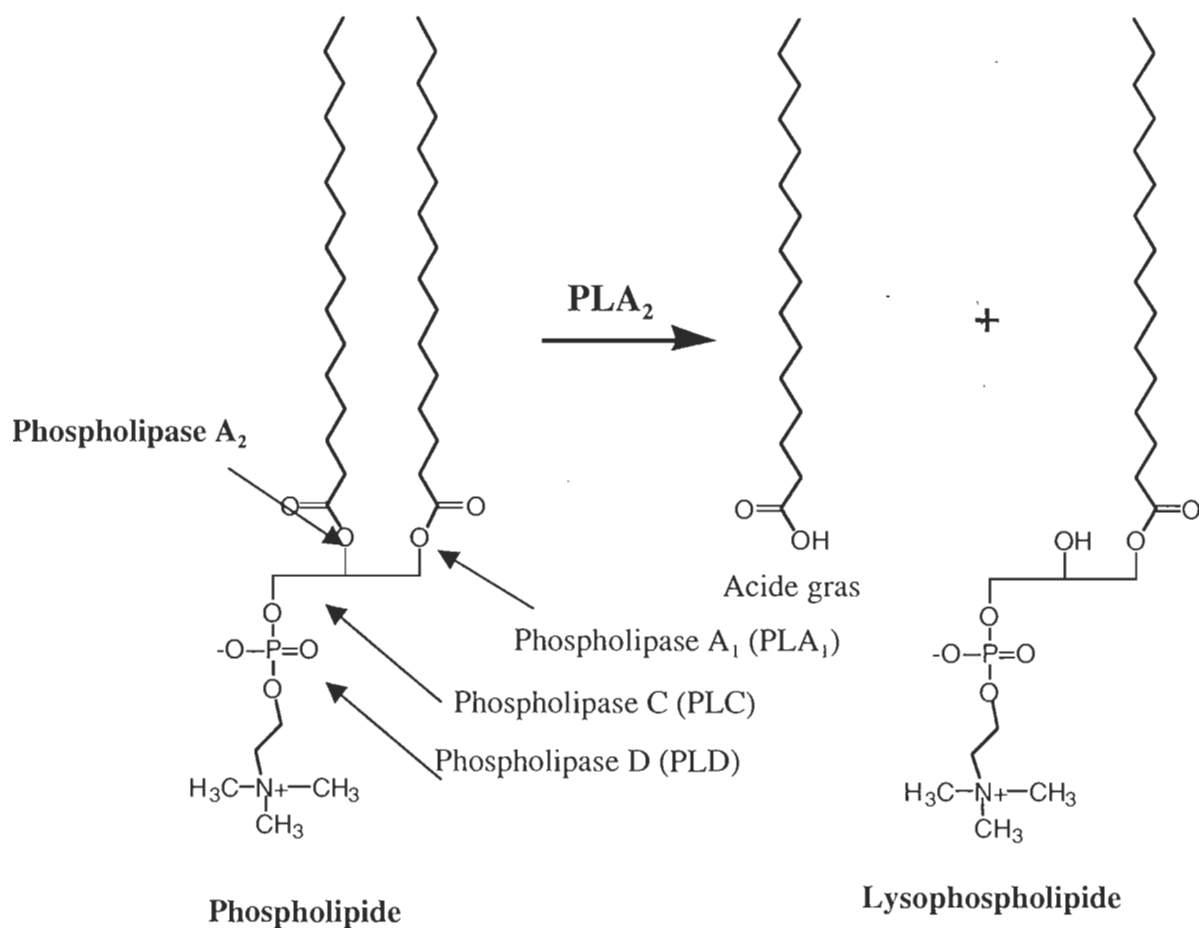


FIGURE 1.9 Activité phospholipase A₂ ainsi que les sites d'hydrolyse des phospholipides par d'autres phospholipases (en gris).

Note : Phospholipase B (PLB) : enzymes possédant à la fois les activités de type PLA₂ et PLA₁.

intracellulaire [64], l'apoptose [65, 66] et le remodelage des phospholipides membranaires [67, 68].

Il existe plusieurs types de phospholipases A_2 qui sont très différents les uns des autres soit par leur localisation cellulaire, leur séquence en acides aminés, leur poids moléculaire, leur dépendance au calcium, leur spécificité pour différents substrats et même par leur mécanisme catalytique. Il existe d'ailleurs une certaine confusion dans la littérature quant à la classification des PLA_2 . Il faut d'abord mentionner que les PLA_2 ont été classées par groupe [69] selon la chronologie de leur découverte. Ainsi le groupe IA est constitué par la PLA_2 extraite du venin de cobra [55, 70] tandis que le dernier groupe venant d'être découvert a été appelé groupe XII [71].

Lorsque deux enzymes sont très similaires et possèdent les mêmes caractéristiques qu'un groupe déjà existant, on forme des sous-groupes. Par exemple, les sous-groupes IA et IB et les sous-groupes IIA, B, C, D, E, F, etc. On peut ensuite les classer par grande famille ou type, principalement selon leur localisation cellulaire. Jusqu'à tout récemment, il y avait trois types de PLA_2 , soit les PLA_2 sécrétées ($sPLA_2$), les PLA_2 cytosoliques ($cPLA_2$) et les PLA_2 calcium indépendantes ($iPLA_2$) [58]. Dernièrement, les acétylhydrolases des facteurs d'agrégation plaquettaire (PAF-AH) ont été classées dans un quatrième type [72]. Il existe aussi une autre classification existante basée sur le mécanisme réactionnel c'est-à-dire l'utilisation d'une histidine ou d'une sérine dans le site catalytique [58].

1.6.1 Les phospholipases A₂ cytosoliques

Comme leur dénomination l'indique, les phospholipases A₂ cytosoliques (cPLA₂) sont des enzymes localisées à l'intérieur des cellules. Elles forment le groupe IV et ses sous-groupes (A, B, C). Contrairement aux sPLA₂, les cPLA₂ n'utilisent pas la combinaison histidine-aspartate pour la catalyse mais une combinaison sérine-aspartate [73-76]. La première cPLA₂ à avoir été découverte [77] et aussi la plus connue est la cPLA₂ du groupe IVA ou cPLA₂ α . Cette enzyme monomérique possède un poids moléculaire de 85 kDa. Elle nécessite une concentration de calcium de l'ordre du μ M pour lier son substrat [78]. Elle se compose de deux domaines, soit le domaine C2 qui est le domaine de liaison au calcium et le domaine α/β hydrolase qui est responsable de l'activité catalytique [73, 79, 80]. Le domaine C2 de cette enzyme permet, lorsqu'il y a une augmentation intracellulaire de concentration en calcium, sa translocation du cytoplasme vers la membrane nucléaire et le réticulum endoplasmique [81, 82]. Elle possède une spécificité marquée envers les chaînes d'arachidonate en position *sn*-2 des phospholipides [83, 84]. De plus, l'activité de cette enzyme augmente de trois fois lorsqu'elle est phosphorylée [85]. Cette cPLA₂ possède une grande affinité pour le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) [86]. En effet, son activité augmente en présence de ce phospholipide [86-88] et, conséquemment la libération d'acide arachidonique [89].

La cPLA₂ du groupe IVB (cPLA₂ β) est la PLA₂ possédant le poids moléculaire le plus élevé (114 kDa) grâce à l'insertion de 242 acides aminés en N-terminale après le domaine C2. Contrairement au groupe IVA, la cPLA₂ du groupe IVB ne semble pas être phosphorylée puisqu'elle ne possède pas les résidus sérines de la cPLA₂ du groupe IVA

[90, 91]. Cette cPLA₂ semble aussi posséder une activité PLA₁ ainsi que lysophospholipase [91].

La dernière représentante de ce type est la cPLA₂ γ ou PLA₂ du groupe IVC. C'est la plus petite des cPLA₂ puisqu'il lui manque le domaine C2. Elle ne possède donc pas de dépendance au calcium ni la capacité de translocation [90, 92]. Elle n'est pas classée parmi les PLA₂ calcium indépendantes (iPLA₂) en raison de l'identité de structure primaire qu'elle possède avec les deux autres cPLA₂. Son affinité relative pour l'AA est aussi environ huit fois plus faible que la cPLA₂ du groupe IVA. Elle possède aussi une activité PLA₁ et lysophospholipase [91, 92].

1.6.2 Les phospholipases A₂ calcium indépendantes

Les phospholipases A₂ calcium indépendantes sont appelées ainsi puisqu'elles n'ont pas besoin de calcium pour exercer leur activité catalytique. Elles forment le groupe VI (A et B) des PLA₂. Le groupe VIA a d'abord été isolé chez les macrophages [93]. Il inclut deux isozymes, l'une de 85 kDa [93] et l'autre de 88 kDa [94]. Le groupe VIA possède deux séquences particulières, soit la séquence catalytique des lipases (Gly-X-Ser-X-Gly) [93] ainsi que sept à huit motifs ankyrines (pour une revue, voir [95]). Contrairement aux autres PLA₂, cette dernière serait active sous forme de tétramère [93]. Les différentes variantes du groupe VIA ont ensuite été identifiées dans différents tissus comme les testicules, les îlots pancréatiques et le cerveau [96]. Lors de fractionnements cellulaires, elles se retrouvent associées aux fractions membranaires [97]. Le groupe VIA possède aussi une activité lysophospholipase [98] et peut hydrolyser à la fois de longues et de courtes chaînes acyles. Elles possèdent aussi une activité acétylhydrolase des facteurs d'agrégation plaquettaire (PAF) [94, 98]. Un des principaux rôles de ce

groupe de PLA₂ est le remodelage des phospholipides membranaires [99]. Le groupe VIB vient d'être découvert en utilisant les banques d'«expressed sequence tags » (EST) [100]. Les PLA₂ de ce groupe possèdent un poids moléculaire de 66-77 kDa.

1.6.3 Les acétylhydrolases des facteurs d'agrégation plaquettaire

Récemment, les enzymes qu'on appelle acétylhydrolases des facteurs d'agrégation plaquettaire (PAF-AH) ont été classées parmi les PLA₂ [72]. Ces enzymes qui appartiennent aux lipases puisqu'elles possèdent le motif catalytique Gly-X-Ser-X-Gly [101], forment les groupes VII et VIII des PLA₂. En plus d'hydrolyser la chaîne *sn*-2 du PAF, une molécule formée d'une tête de polaire de phosphatidylcholine, d'un groupement acétyle en *sn*-2 et d'une chaîne grasse liée par un groupement éther en *sn*-1. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser de courtes chaînes grasses oxydées (jusqu'à neuf carbones) en position *sn*-2 des phospholipides PC ou PE [102, 103]. Contrairement aux autres PLA₂, les PAF-AH ne sont pas des enzymes interfaciales c'est-à-dire qu'elles ne se lient pas à leur substrat sous forme d'agrégat comme les membranes mais montrent plutôt une affinité pour des phospholipides oxydés et/ou tronqués qui sont solubles [102]. Les PAF-AH sont très importantes dans le processus d'inflammation et de renouvellement des phospholipides membranaires. Depuis longtemps, on pense que les sPLA₂ sont responsables de l'hydrolyse des phospholipides oxydés [104-106] mais récemment, un groupe de chercheurs a démontré que les sPLA₂ de même que les cPLA₂ n'ont pas plus d'affinité pour les phospholipides oxydés que pour les autres phospholipides [107]. Ils ont donc émis l'hypothèse que le rôle de renouvellement des phospholipides membranaires oxydés incombe aux PAF-AH à cause de leur affinité pour ces derniers.

1.6.4 Les phospholipases A₂ sécrétées

Les sPLA₂ sont de petites protéines de 13-18 kDa, avec un pH optimum de 7-9. Une concentration de calcium de 1 à 10 mM est requise pour leur activité catalytique [108]. Elles possèdent de 12 à 16 cystéines qui leur confèrent une structure très rigide et leur permettent ainsi de résister à une extraction à l'acide sulfurique [109] ainsi qu'à la dénaturation thermique [110, 111]. Ces ponts disulfures sont nécessaires à leur activité catalytique bien qu'ils ne sont pas essentiels au bon repliement de la protéine [112]. Chacun des groupes de sPLA₂ possède des combinaisons de résidus formant des ponts disulfures (S-S) spécifiques et c'est d'ailleurs par cette propriété que les groupes de sPLA₂ ont été classés. Les sPLA₂ peuvent même être actives dans certains solvants organiques [113, 114]. Les sPLA₂ sont sélectives envers les têtes polaires et mais pas vis-à-vis le type d'acide gras en position *sn*-2 des phospholipides, contrairement aux cPLA₂. Pour une revue sur la spécificité des phospholipases A₂, voir les références [58, 115]).

Le mécanisme d'action des sPLA₂ diffère des autres PLA₂. Elles utilisent une triade catalytique particulière constituée des résidus His-48 et Asp-49 et d'un ion calcium. Les doublets électroniques de l'His-48 arrachent un proton à une molécule d'eau qui le récupère en attaquant le groupement carbonyle de l'acide gras en position *sn*-2 du phospholipide [116]. Le résidu Asp-49 vient stabiliser l'ion calcium qui neutralise la charge négative portée par le groupement phosphate de la tête polaire des phospholipides [116]. Lors de la catalyse, l'ion Ca²⁺ est stabilisé par l'Asp-49 et se lie à une séquence très bien conservée chez toutes les sPLA₂, appelée boucle de liaison du calcium [69, 117].

Ce mécanisme explique pourquoi les sPLA₂ ont besoin de calcium pour leur activité catalytique et leur inhibition par la présence d'EGTA, un chélateur d'ions calcium [118]. Elles sont aussi inhibées par de petites molécules, comme le bromure de para-bromophénol (BpBP), qui peuvent pénétrer dans la poche catalytique et qui dénaturent le résidu histidine.

Les différents groupes de sPLA₂, en plus de posséder des caractéristiques structurales différentes les uns des autres, possèdent aussi des affinités différentes pour les phospholipides (voir Tableau 1.1). Ainsi, les sPLA₂ du groupe IB lient plus fortement les phospholipides anioniques que les phospholipides neutres pour lesquels, tout de même, elles possèdent une affinité significative [119]. Elles ne sont pas affectées par les agents réducteurs des ponts S-S comme le dithiothréitol (DTT) ou le β -mercaptoéthanol. Elles possèdent cinq résidus supplémentaires qui leur sont spécifiques et qu'on appelle « boucle pancréatique ». De plus, elles ont un pont S-S formé entre les résidus 11 et 77. Ces sPLA₂ de type IB, que l'on désigne aussi sous l'appellation phospholipases pancréatiques, ont été identifiées dans le pancréas mais aussi dans d'autres tissus qui n'ont pas de fonction digestive, comme la rate [120], ce qui permet de s'interroger sur le rôle qu'elles pourraient jouer dans ces tissus [121, 122]. Il est à noter que la numérotation des résidus de toutes les sPLA₂ est basée sur un alignement de leur séquence primaire avec celle de la sPLA₂ du groupe IB [123].

Les sPLA₂ du groupe II (A, B, C, D, E, F) possèdent toutes une très faible affinité pour les phospholipides neutres (PC entre autres), mais elle augmente de plus de 10⁶ fois lorsqu'on les mélange à des phospholipides anioniques [124] pour lesquels elles ont beaucoup plus d'affinité [115]. Le principal représentant de ce groupe chez l'humain est le sous-groupe IIA qu'on retrouve dans le fluide synovial arthritique et dans le sérum de patients souffrant de maladies inflammatoires comme la pancréatite [125] ainsi que dans

TABLEAU 1.1 : Caractéristiques des phospholipases A₂ sécrétées

Groupe		Source	Spécificité	Taille (kDa)	Ponts S-S uniques	Nombre de ponts S-S	Extension C-terminale
I	A	Venin de cobra	PE > PC	13-15	11-77	7	Aucun
	B ^a	Pancréas mammifères	PE > PC	13-15	11-77	7	Aucun
II	A	Liquide synoviale	PS=PG=PE>>PC	13-15	50-137	7	7 résidus
	B	Venin de vipère	PS=PG=PE=PI>>PC	13-15	50-137	6	6 résidus
	C ^b	Testicules rat/souris	PI>PE=PC	15	50-137, 86-92	8	7 résidus
	D	Rate/pancréas mammifère	PG=PE=PC	14-15	50-137	7	7 résidus
	E	Cerveau/cœur/utérus	PG>PE>PC	14-15	50-137	7	7 résidus
	F	Testicules/embryons souris	PG>>PC	16-17	50-137	7	30 résidus
V		Cœur/poumons/macrophages mammifères	PE=PC	14	Aucun	6	Aucun
X		Rate/thymus/leukocyte humain	PE=PC	14	11-77, 50-137	8	8 résidus
III ^c		Venin abeille/lézard/scorpions et humain	PG>PC	15-18	N/D	5	N/D
IX		Venin escargot	N/D	14	N/D	6	N/D
XI	A	Riz vert	N/D	12,4	N/D	6	N/D
	B	Riz vert	N/D	12,9	N/D	6	N/D
XII		Cœur/muscle/rein/pancreas humain	N/D	20	N/D	N/D ^d	N/D

^a Le groupe IIB possède 5 résidus qui forment la boucle pancréatique

(adapté de [58])

^b Chez l'humain, le groupe IIC est un pseudogène

^c Le groupe III humain possède une taille de 55 kDa et des extensions en N- et C-terminales

^d Le type XII possède 14 cystéines

PE (phosphatidyléthanolamine), PC (phosphatidylcholine), PS (phosphatidylsérine), PG (phosphatidylglycerol), PI (phosphatidylinositol), N/D (données non disponibles).

les tissus rétinien [126]. Les sPLA₂ du sous-groupe IIA sont aussi présentes dans les larmes où elles joueraient un rôle bactéricide [127, 128]. Le groupe IIA a longtemps été directement associé à la libération d'AA lors de la réponse inflammatoire [115] étant donné sa concentration élevée lors des phénomènes inflammatoires [129]. On expliquait son absence de sélectivité envers un type de chaîne acyle en position *sn*-2 des phospholipides par son abondance dans les tissus inflammés, ce qui n'expliquait toutefois pas la libération spécifique d'AA, un précurseur de médiateurs de l'inflammation comme les leucotriènes et les éicosanoïdes [129]. Cependant, depuis quelques années, on croit que cette libération serait due à une cPLA₂ [130, 131] qui serait activée par la sPLA₂ du groupe IIA ou V via un récepteur spécifique [132, 133]. Comme le groupe IB, le groupe IIA possède sept ponts S-S dont un entre les résidus 50 et 137 qui lui est spécifique. Le groupe IIA, comme les autres membres du groupe II, possède la particularité d'avoir une extension en C-terminale, soit sept acides aminés. Ces sPLA₂ sont résistantes à la chaleur [118] mais sont sensibles à l'action d'agents réducteurs des ponts S-S [134]. Les autres sPLA₂ du groupe II ont sensiblement les mêmes propriétés que le groupe IIA mais on ne connaît pas encore le rôle physiologique de celles qui sont exprimées chez l'humain. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 1.1. Il est à noter que toutes les sPLA₂ du groupe II et V se situent sur le même chromosome en position 1p34-36.

Les sPLA₂ du groupe III sont principalement exprimées dans les venins d'insectes comme les abeilles et les scorpions de même que chez certaines méduses et lézards. On a récemment découvert une enzyme humaine appartenant à cette catégorie [135]. Bien que cette enzyme soit beaucoup plus grosse que celles de ce groupe chez les autres animaux, elle possède une région centrale de 16 kDa hautement conservée.

Comme les autres sPLA₂, elles hydrolysent préférentiellement les phospholipides anioniques plutôt que neutres [58].

Les sPLA₂ du groupe V sont connues depuis seulement quelques années [136, 137]. Elles sont exprimées par les macrophages, le cœur, les poumons [58, 123] ainsi que par les tissus rétiens [126]. Elles possèdent six ponts S-S dont aucun ne leur est propre. Ces protéines ne possèdent pas non plus d'extension en C-terminale. Les sPLA₂ de ce groupe possèdent une grande activité catalytique envers les phospholipides anioniques de même que les phospholipides neutres, contrairement au groupe IIA [136, 137]. Ces PLA₂ sont impliquées dans les signaux de transduction intracellulaire de même que dans la réponse inflammatoire [138-142]. Leur rôle n'est pas encore tout à fait bien connu, mais on sait que chez des souris «knock-out» en sPLA₂ du groupe IIA, les PLA₂ du groupe V prennent la relève des fonctions physiologiques assumées par celles du groupe IIA [138].

Deux autres groupes de sPLA₂ ont été caractérisés chez l'humain, soit le groupe X et le groupe XII. Les sPLA₂ du groupe X possèdent les deux ponts S-S spécifiques aux sPLA₂ des groupes I et II qui se situent, respectivement, entre les résidus 11-77 et 50-137. Ces sPLA₂ possèdent aussi une extension de huit résidus en C-terminale. Contrairement aux autres sPLA₂, celles du groupe X semblent être plus actives envers les phospholipides neutres telles que la PE et la PC [143, 144]. Elles semblent aussi être impliquées dans la production d'AA [143]. Ces sPLA₂ sont exprimées dans le pancréas, les poumons et le colon [143]. Le dernier groupe de la famille des sPLA₂ à avoir été découvert chez l'humain est le groupe XII. Ces sPLA₂ sont fortement exprimées dans le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas. Elles hydrolysent préférentiellement la phosphatidylglycérol (PG) et la PS et possèdent aussi une certaine

activité pour la PC. Les principales caractéristiques de ces deux groupes sont résumées au Tableau 1.1.

1.7 Acylation des protéines

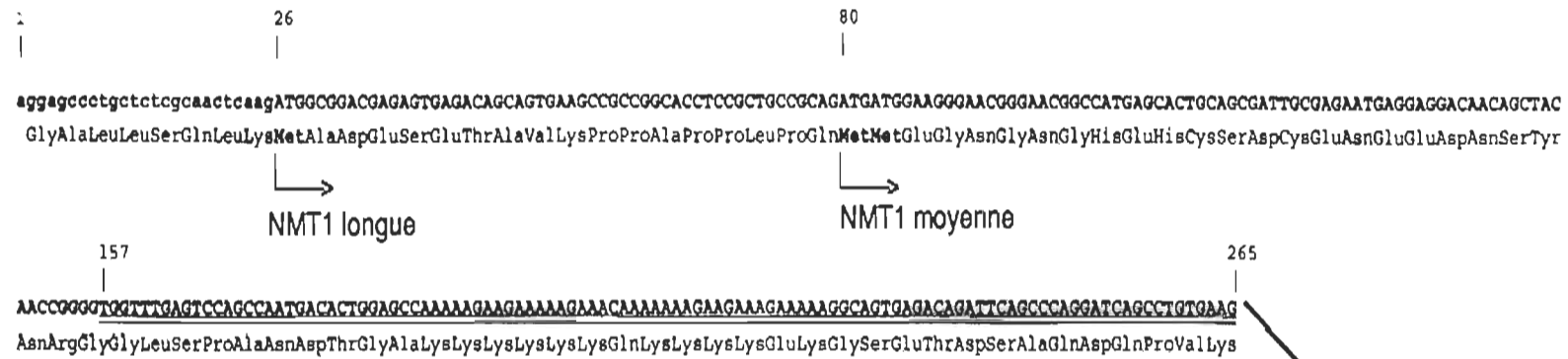
L'acylation des protéines est une modification post-traductionnelle fréquente chez les protéines virales et eucaryotes [145] qui consiste en la liaison covalente d'une chaîne acyle à une protéine, ce qui lui confère une plus grande hydrophobicité. L'acylation des protéines sert principalement à permettre leur liaison aux membranes. Les protéines acylées peuvent être impliquées dans la signalisation et la régulation cellulaire ou dans des transformations cellulaires [146-149]. Chez les eucaryotes, il existe principalement deux types d'acylation. Dans la S-acylation, une chaîne acyle est liée à une protéine à l'aide d'une liaison ester ou thioester, d'où son nom de S-acylation [145]. Ce type d'acylation peut se produire de façon non enzymatique, comme pour la rhodopsine [150], ou par des enzymes appelées S-acyltransférases qui ont une préférence pour le palmitate comme substrat, bien qu'elles soient capables d'incorporer d'autres acides gras à longue chaîne comme le stéarate, l'oléate et l'arachidonate [151]. L'autre type principal d'acylation est la N-acylation où une chaîne acyle est liée à l'extrémité N-terminale de la protéine par une liaison amide. L'enzyme responsable de ce type d'acylation est appelée N-myristoyltransférase puisqu'elle a d'abord été caractérisée comme une enzyme pouvant lier un myristate à l'extrémité N-terminale des protéines.

1.7.1. La N-myristoylation

La tétradécanoyl-CoA : glycylopeptide N-tétradécanoyl-transférase (EC 2.1.3.97) aussi connue sous le nom de N-myristoyltransférase (NMT) est une enzyme endogène qui transfère un acide myristique sur le résidu N-terminale d'un peptide à partir d'un myristoyl-CoA. Cette enzyme a d'abord été isolée chez la levure [152, 153] et ensuite chez l'humain grâce à son identité avec le gène de la levure [154]. Il existe deux types de NMT qui sont codés par deux gènes différents chez l'humain. Le premier gène (*nmt1*) se situe sur le chromosome 17 et code pour trois isoformes, soit la NMT1 courte (417 résidus), la NMT1 moyenne (478 résidus) et la NMT1 longue (496 résidus) (voir Figure 1.10) [155, 156]. L'isoforme court est produit par un épissage alternatif en N-terminale de la séquence codante, ce qui entraîne un changement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon d'arrêt au début de la séquence codante. L'initialisation de la traduction se fait alors 240 nucléotides en aval, ce qui cause un isoforme tronqué de 80 résidus par rapport à l'isoforme long. L'isoforme moyen est produit par un site d'initiation alternatif, ce qui tronque l'isoforme long de 18 résidus. Le deuxième gène (*nmt2*) est situé sur le chromosome 10 et semble codé que pour une seule enzyme de 498 résidus nommée NMT2. Cette dernière a été isolée récemment [157] et n'a pas encore été caractérisée biochimiquement. Il est important de noter que bien qu'on connaisse la structure des NMT de levures [158], aucune structure de NMT humaine ou de mammifères n'a encore été déterminée.

Dans tous les tissus étudiés jusqu'à maintenant, excepté la rétine, les NMT sont responsables d'une N-acylation homogène (ou N-myristoylation) de certaines protéines,

NMT1 longue



NMT1 courte

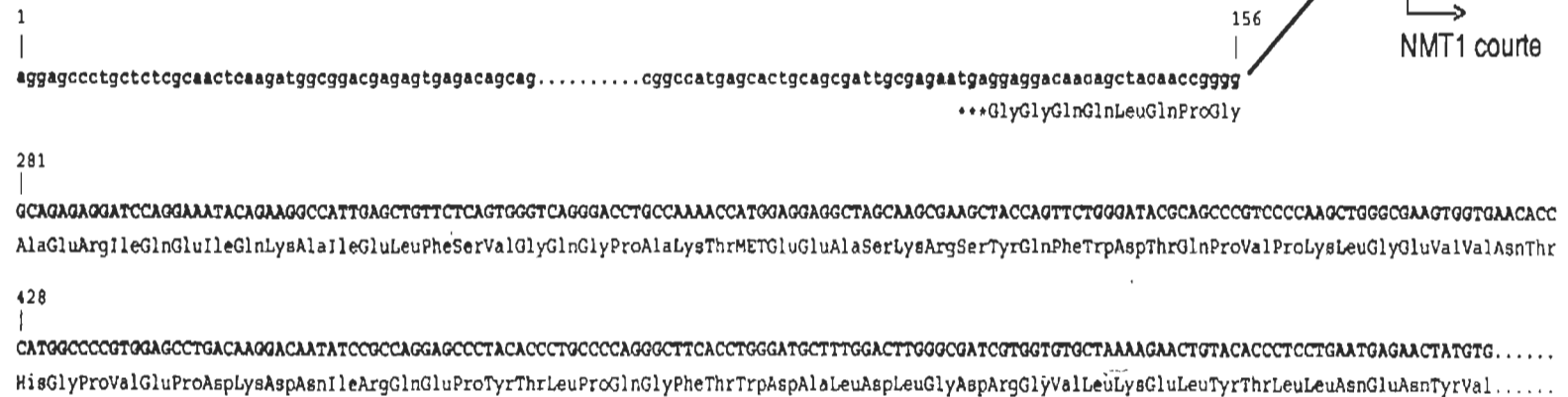


FIGURE 1.10 Isoformes de la NMT1. La NMT1 longue (NMT1_L) et la NMT1 courte (NMT1_c) sont différentes formes d'épissage de la NMT1. On peut voir les deux sites d'initiation de la traduction pour la NMT1_L et pour la NMT1 moyenne (NMT1_M). On peut aussi voir le site d'initiation de la NMT1_c qui est incluse dans la séquence de NMT1_L et de NMT1_M (adapté de(156)).

c'est-à-dire de la liaison covalente d'un acide myristique (14 : 0) à l'extrémité N-terminale des protéines (pour une revue, voir [159]). Il a été démontré que cette modification se produisait de façon co-translationnelle alors que le peptide naissant est encore lié au ribosome [160]. La spécificité de la NMT pour certaines protéines est encore mal connue. Cependant, l'analyse des séquences en N-terminale des protéines acylées démontre un motif conservé du site de reconnaissance de la NMT. La présence essentielle d'une glycine en N-terminale du peptide à acyler est nécessaire et des résidus sérine ou thréonine sont présents à la position 5 en N-terminale chez 75% des protéines reconnues comme étant N-myristoylées [151].

1.7.2 Hétéroacylation des protéines rétinienne

La rétine est le seul tissu qui possède des protéines qui sont N-acylées de façon hétérogène (pour une revue, voir [151]). Il a été démontré *in vitro* que les NMT humaines et de levures ont la capacité de lier de nombreuses chaînes acyles différentes sur des peptides contenant le motif spécifique de reconnaissance des NMT [161, 162]. C'est en 1992 qu'il a été démontré que des protéines du processus visuel comme la recoverine et la sous-unité α de la transducine ($T\alpha$), étaient acylées de façon hétérogène chez le bovin [163, 164]. Les résultats obtenus par le groupe de Walsh [163, 164] ont démontré que ces protéines sont acylées avec quatre groupements acyles différents à l'extrémité N-terminale et que la population majoritaire est le 14 : 1. Il a ensuite été démontré que la N-acylation hétérogène se produit aussi chez l'humain mais seulement dans la rétine avec un contenu en chaînes acyles semblable à celui retrouvé chez le bœuf [165]. L'hétéroacylation des protéines semble être un phénomène spécifique au tissu rétinien de mammifères puisque, chez les amphibiens (v.g. la grenouille), la sous-unité α de la transducine est acylée de façon homogène par une chaîne acyle 14 : 2. Plusieurs

questions restent en suspens quant au rôle de l'hétéroacylation dans la rétine. Puisque les protéines hétéroacylées sont impliquées dans le processus de phototransduction (voir Figure 1.4), l'explication la plus intéressante à l'heure actuelle est que des populations

différentes d'une de ces protéines peuvent jouer un rôle différent dans la modulation de la phototransduction dépendant des conditions de luminosité [151].

1.7.3 N-myristoylation des phospholipases A₂

Même si ce mémoire inclut l'étude de deux protéines différentes, il est intéressant de noter que certaines PLA₂ sont N-myristoylées. Comme il a été mentionné à la section 1.6, les PLA₂ sont des enzymes qui ont la particularité de se lier aux membranes pour hydrolyser les phospholipides. Cependant, certaines PLA₂ n'ont pas de domaine leur permettant de se fixer aux membranes. Les cPLA₂ du groupe IVC ne possèdent pas de domaine C2 comme les groupes IVA et IVB (voir section 1.6.2). Elles ne peuvent donc pas se lier aux membranes comme les autres cPLA₂. Leur N-myristoylation devrait cependant leur permettre d'accomplir cette fonction [58]. De plus, les PLA₂ du groupe VIIA (PAF-acétylhydrolases) possèdent aussi un myristate pouvant leur permettre de se lier aux membranes, ce qui pourrait expliquer leur activité envers des vésicules de phospholipides.

1.8 Objectifs du travail de recherche décrit dans ce mémoire

Le présent travail de recherche est séparé en deux parties. La première partie était de déterminer quelles PLA₂ sécrétées sont présentes dans les tissus rétiens, ce qui

faisait suite aux travaux de Michèle Jacob qui a mesuré une activité phospholipasique dans l'EPR bovin [166-168] et à ceux de Céline Van Themsche qui a détecté, dans l'EPR humain en culture, une phospholipase A₂ sécrétée différente de celles déjà caractérisées [169]. Cette sPLA₂ était cependant reconnue par un anticorps dirigé contre la sPLA₂ du groupe IIA. Nous avons donc entrepris la caractérisation de cette protéine en utilisant principalement deux approches en parallèle.

1.8.1 Objectifs pour les sPLA₂

Les objectifs de la première partie de ce mémoire étaient d'identifier et de caractériser les sPLA₂ exprimées par l'EPR et ce, en utilisant les approches suivantes :

- 1) Purifier les sPLA₂ sécrétées par les cellules d'EPR humain en culture afin de les séquencer. Pour purifier ces sPLA₂, diverses manipulations ont été faites : précipitation au (NH₄)₂SO₄, chromatographie sur échangeuse de cations, chromatographie d'affinité et chromatographie d'interactions hydrophobes. Aucune de ces chromatographies n'a permis de purifier les sPLA₂ de l'EPR de façon homogène et en assez grande quantité pour le séquençage. Nous n'avons pas poussé cette approche plus loin puisque la deuxième approche a fonctionné plus rapidement.
- 2) Amplifier les séquences de sPLA₂ transcrites par les tissus réiniens par RT-PCR en utilisant différentes amorces spécifiques ainsi que des amorces dégénérées dans des régions conservées des différentes sPLA₂ connues.

1.8.2 Objectifs pour les NMT

L'objectif de la deuxième partie de ce mémoire était :

Identifier les types de NMT exprimés par la rétine et l'EPR par RT-PCR et déterminer si ces NMT sont différentes de celles déjà caractérisées.

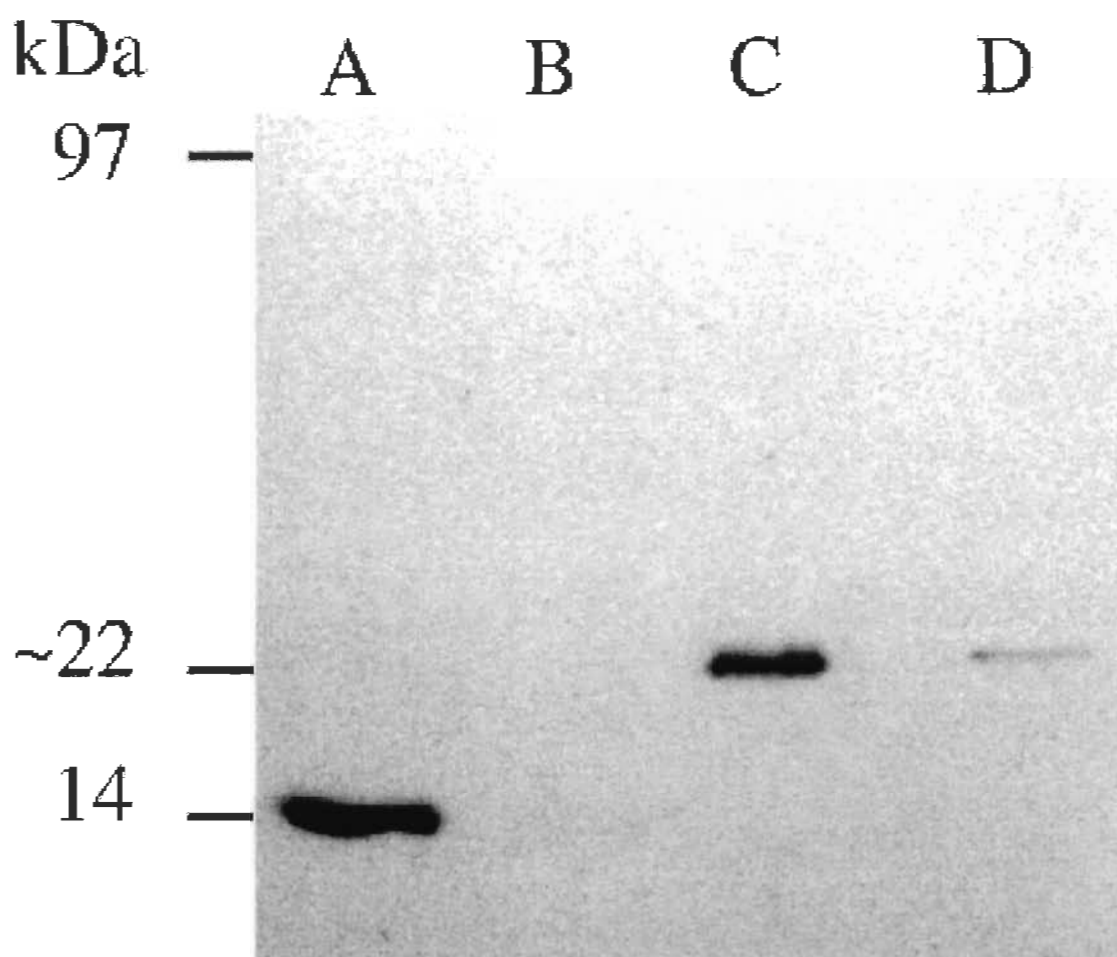
CHAPITRE 2

TENTATIVES DE PURIFICATION DES sPLA₂ À PARTIR DES CELLULES D'EPR HUMAIN EN CULTURE

2.1 Hypothèse de départ

Deux étudiantes du laboratoire ont travaillé sur les PLA₂ de l'EPR. D'abord Michèle Jacob s'est intéressée aux PLA₂ exprimées par l'EPR bovin [167]. Elle a partiellement purifié ces protéines et a déterminé que les fractions enrichies ne se comportaient pas comme les PLA₂ déjà caractérisées à cette époque. Par la suite, Céline Van Themsche a déterminé que l'EPR humain en culture sécrétait une sPLA₂ différente de celles déjà caractérisées [169]. Elle a démontré par immunobuvardage de type Western que cette sPLA₂ était reconnue par un anticorps dirigé contre les résidus en N-terminal de la sPLA₂ humaine du groupe IIA mais que sa taille était différente de la sPLA₂ du groupe IIA, soit de 22 kDa au lieu de 14 kDa (voir Figure 2.1). Cette sPLA₂ était aussi faiblement reconnue par un anticorps dirigé contre la sPLA₂ entière du groupe IB.

L'hypothèse que nous avons à ce moment était que l'EPR sécrétait une sPLA₂ différente de celles qui sont connues mais qu'elle possédait une identité avec la sPLA₂ du groupe IIA, du moins à l'extrémité N-terminale, et une identité de structure avec la sPLA₂ du groupe IB (voir Figure 2.2). C'est sur ces bases que nous avons entrepris la purification de cette sPLA₂. La purification n'a pas été menée à terme, mais différents essais préliminaires de purification ont été effectués. Ces méthodes n'ont pas été poussées plus loin parce qu'une approche par RT-PCR nous a permis de déterminer quelles sPLA₂ sont exprimées par les cellules d'EPR en culture.



(Tirée de [169])

FIGURE 2.1 Résultats d'immunobuvardage de type Western. Le puits A contient de la sPLA₂ humaine du groupe IIA. Le puits B contient de la cPLA₂ α humaine. Les puits C et D contiennent du milieu de culture (35 μ g) d'EPR humain. Les puits A, B et C ont été révélés avec un antisérum dirigé contre les résidus 1-14 en N-terminal de la sPLA₂ humaine du groupe IIA. Le puits D a été révélé avec un antisérum anti-sPLA₂ du groupe IB.

IB_PORCINE	1	MK-FLVLAVL	LTVGAAQEGI	SSRALWQFRS	MIKCAIPGSH	PLMDFNNYGC
IIA_HUMAINE	1	MRTLALLLAVI	MIFGLLQAHG	N---LVNFHR	MIKLTTGKEA	ALSYGF-YGC
IB_PORCINE	50	YCGLGGS	GTP	VDELDRCCET	HDN	NCYRDAKN LDSC-KFLVD NPYTESYSYS
IIA_HUMAINE	47	HCGVGGR	RGSP	KDATDRCCVT	HDCCYKRLEK	RGCGTKFL-- -----SYKFS
IB_PORCINE	99	CSNTEITCNS	KNNACEAFIC	NC	DRNAAICF	--SKAPYNKE HKNLDTKKY-
IIA_HUMAINE	90	NSGSRITC-A	KQDSCRSQLC	EC	DKAAATCF	ARNKTTYNKK YQYYSNKHCR
IB_PORCINE		-----				
IIA_HUMAINE	139	GSTPRC				

FIGURE 2.2 Comparaison de la structure primaire des sPLA₂ du groupe IB et du groupe IIA. En rouge, le peptide signal clivé lors de la maturation. En bleu, la séquence de reconnaissance de l'antisérum dirigé contre le type IIA. En vert, la séquence de liaison du calcium. En rose, le site catalytique.

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Matériel

Le matériel de départ pour la purification des sPLA₂ sécrétées par l'EPR humain en culture était le milieu de culture de ces cellules, soit du «Keratinocyte-SFM medium» (Canadian Life Technologies, Burlington, Ont., Canada) supplémenté avec 5% de sérum de veau (BCS) [Hyclone, Logan, Utah, USA] et 200 mg/ml d'albumax, 45 mg/ml d'acide ascorbique, 1 mg/ml de carnitine, 500 mg/ml de glucose, 112 mg/ml de fructose, 5 mg/ml de glutathione, 6 mg/ml d'hypoxanthine, 67 mg/ml d'acide oxalacétique, 0.15 mg/ml d'acétate de rétinol, 5 mg/ml de taurine, 0.025 mg/ml de D- α -tocophérol, 50 mg/ml de transferrine et 0.3 mg/ml d'uridine après 48 à 72 h en culture. Le milieu a été filtré dans des conditions stériles avec un filtre de 0.22 μ m et conservé à 4°C pour utilisation ultérieure.

2.2.2 Détermination de l'activité PLA₂

Le dosage de l'activité PLA₂ a été fait selon une modification de la méthode de Bayburt *et al.* [170] en utilisant un lecteur de plaque à fluorescence (Cytofluor 4000®, Perseptive Biosystems). Le dosage est fait en hydrolysant des vésicules de 1-hexadécanoyl-2-(1-pyrènedécanoyl)-*sn*-glycéro-3-phosphométhanol (10-PyPM) à 37°C à raison de 900 pmol par puits (200 μ l) dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 10 mg/ml d'albumine bovine sérique à pH 9.0. Les vésicules ont été préparées par sonication (10 secondes à puissance maximale) à l'aide d'une microsonde en titane. L'hydrolyse est suivie en observant l'augmentation de la fluorescence émise à 380 nm lorsqu'on excite à 340 nm et ce, à toutes les 2 minutes (voir

Figure 2.3 pour un exemple de cinétique). L'augmentation de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'acide 1-pyrène-décanoïque libéré et par conséquent à la quantité de 10-PyPM hydrolysé. On utilise de l'acide 1-pyrène-décanoïque comme standard pour déterminer l'activité PLA₂ de chaque échantillon (Figure 2.4) qui est exprimée en pmoles d'acide 1-pyrène-décanoïque/heure. La mesure de l'activité spécifique PLA₂ permet de déterminer l'efficacité de la purification par la mesure de l'activité spécifique (pmoles d'acide 1-pyrène-décanoïque/heure/mg de protéines). Le dosage des protéines pour la détermination de l'activité spécifique de toutes les expériences a été fait par la méthode BCA (Pierce, Rockford, IL, États-Unis) selon le protocole de la compagnie. Tous les échantillons ont été dialysés dans du PBS à pH 7.4 avant d'être dosés.

2.2.3 Précipitation au (NH₄)₂SO₄

Nous avons effectué des essais pour déterminer les conditions optimales de précipitation de la sPLA₂ au (NH₄)₂SO₄ (Fisher Scientific, Montréal, Canada). Les valeurs de (NH₄)₂SO₄ utilisées sont exprimées en pourcentage de saturation [171] et sont présentées dans le Tableau 2.1. Des concentrations de 45 à 85 % de saturation de (NH₄)₂SO₄ ont été ajoutées à 10 ml de milieu de culture d'EPR qui était conservé sur glace. Les mélanges ont été agités pendant 1 heure sur glace en prenant soin de ne pas faire d'émulsion. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 5 ml de PBS (10 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4). Le surnageant et le culot ont ensuite été dialysés à 4 °C dans du PBS pendant 24 heures avec deux changements de tampon. La concentration en protéine et l'activité PLA₂ ont ensuite été déterminés dans les culots et les surnageants de chaque pourcentage de saturation.

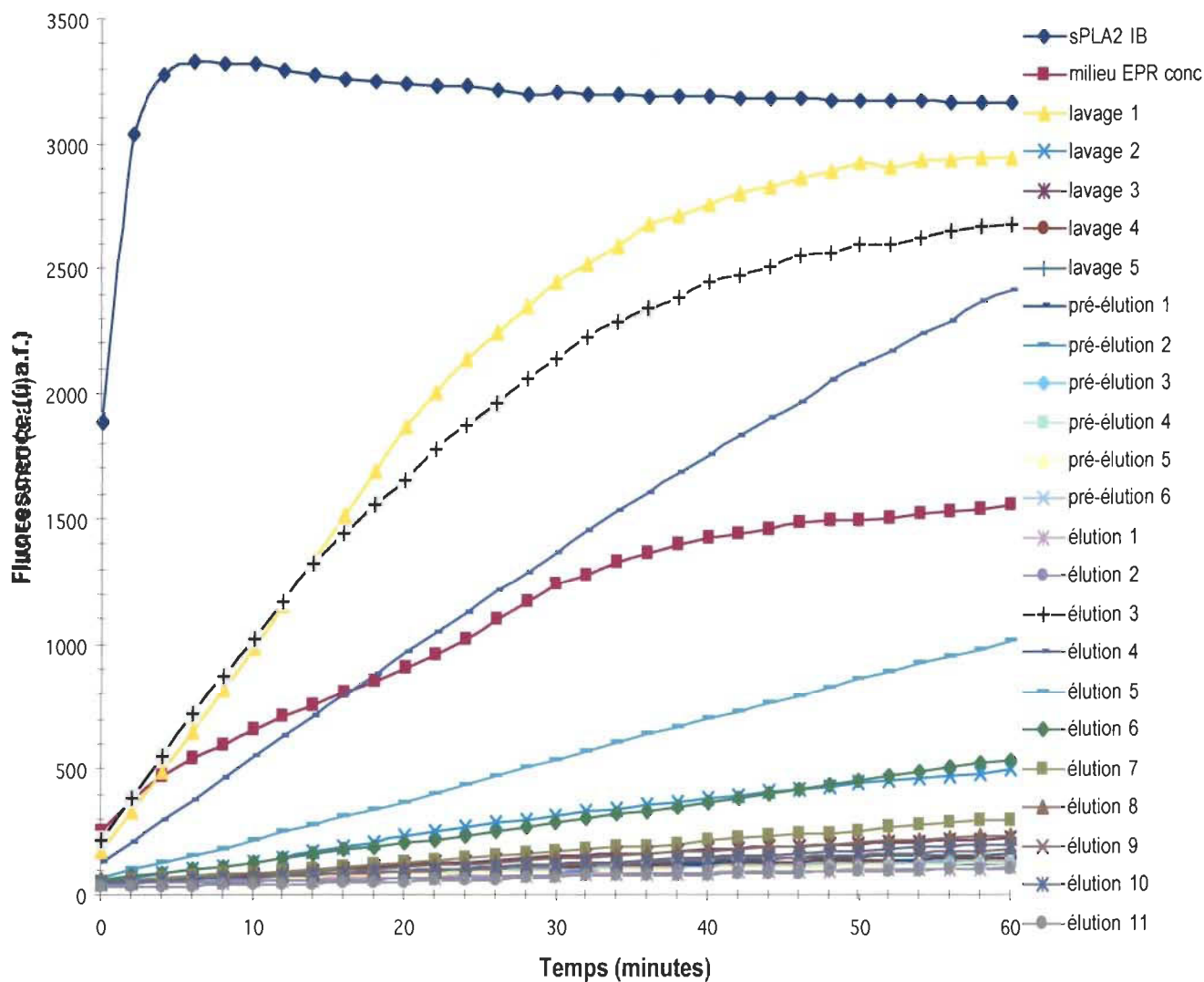


FIGURE 2.3 Exemple de cinétique enzymatique utilisée lors du dosage des sPLA₂ des fractions d'élution de la chromatographie d'interactions hydrophobes (voir section 2.3.3). La fluorescence est exprimée en unités arbitraires de fluorescence (u.a.f.).

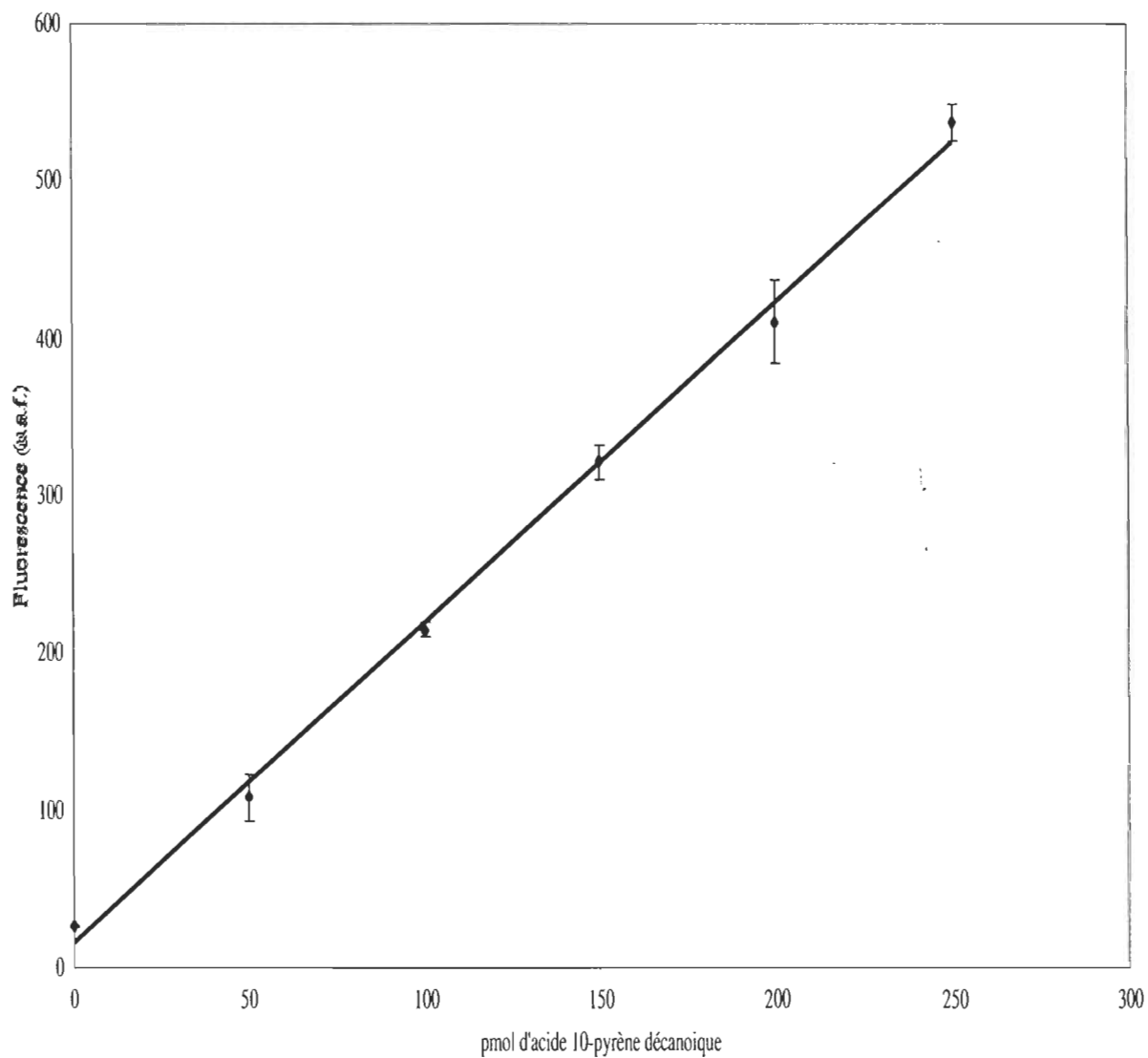


FIGURE 2.4 Courbe d'étalonnage de la fluorescence de l'acide 10-pyrène décanoïque en fonction de sa concentration. La fluorescence est exprimée en unité arbitraire de fluorescence (u.a.f.).

TABLEAU 2.1 Tableau de précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

	Concentration finale																			
Concentration de départ	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%	95%	100%
0%	27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5%		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10%			28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15%				28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20%					29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25%						29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30%							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35%								30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40%									31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45%										31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50%											32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55%												33	66	101	138	175	215	256	298	343
60%													33	67	103	140	179	219	261	305
65%														34	69	105	143	183	224	266
70%															34	70	107	146	186	228
75%																35	72	110	149	190
80%																	36	73	112	152
85%																		37	75	114
90%																			37	76
95%																				38

Les valeurs sont exprimées en grammes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ajoutés à 1 litre de solution à 0 °C (tirée de [171]). Les valeurs en gras sont les concentrations de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilisées lors de l'expérimentation.

2.2.4 Chromatographie sur échangeuse de cations

Le milieu de culture a été dialysé contre le tampon d'équilibration de la colonne (PBS pH 6.0) à 4 °C pendant 24 heures avec deux changements de tampon. Nous n'avons pas concentré le milieu de culture pour cette chromatographie puisque ce type de chromatographie permet l'utilisation d'un grand volume lors de la liaison à la colonne. Le milieu de culture dialysé a été injecté sur une colonne Hi-Trap SP échangeuse de cations à un débit de 0.5 ml/min. Cette colonne est couplée à un système FPLC de Pharmacia (Baie d'Urfé, Qué., Canada). Les protéines non liées ont été éluées avec le tampon d'équilibration de la colonne jusqu'à l'obtention d'une DO_{280} stable. Les protéines liées à la colonne ont été ensuite éluées en une seule étape avec un tampon à force ionique élevée (50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, pH 6.0) à un débit de 0.5 ml/min.

2.2.5 Chromatographie d'interactions hydrophobes

Le milieu de culture a été concentré comme décrit à la section 2.2.4 et dialysé contre le tampon de liaison à la colonne (20 % $(NH_4)_2SO_4$ (p/v) et 1 M NaCl). Ce milieu de culture est injecté sur une colonne de 25 ml de phényle Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qué., Canada) à un débit de 0.5 ml/min. La colonne est rincée avec le même tampon jusqu'à l'obtention d'une DO_{280} stable. Les protéines liées à la colonne sont ensuite éluées avec 2 volumes de colonne en utilisant un gradient de 100 % de tampon de liaison à 0 % (eau pure) à un débit de 0.5 ml/min.

2.2.6 Chromatographie d'affinité

Nous avons d'abord tenté de mettre au point une chromatographie d'affinité en liant directement l'antisérum de lapin dirigé contre la portion N-terminale de la sPLA₂ du groupe IIA sur une résine avec un groupement cyanogène. Cet antisérum reconnaît une sPLA₂ du milieu de culture de l'EPR (voir Figure 2.1). Cette approche n'a pas fonctionné puisque ce type de résine lie les amines libres des protéines en général. Étant donné que nous utilisons un antisérum, plusieurs protéines sériques de lapin, autres que les anticorps, se sont donc retrouvées liées à la résine. De plus, les anticorps étaient liés à la résine sans orientation précise ce qui diminuait la probabilité qu'ils lient les sPLA₂. Nous n'avons pas réussi à enrichir en sPLA₂ des milieux de culture avec cette chromatographie et même, dans certains cas, nous avions une activité spécifique plus faible que la fraction de départ. Nous avons donc choisi une autre façon de lier notre anticorps à une résine.

Nous avons donc tenté de mettre au point une chromatographie d'affinité en liant le même antisérum à une résine de Sepharose protéine-A (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qué., Canada). Cette résine possède l'avantage de lier les anticorps de l'antisérum et de les orienter de façon à lier l'antigène (la sPLA₂). On incube 1 ml d'antisérum avec 1 ml de résine pendant 1 heure à 20 °C pour permettre à la protéine-A de lier les anticorps de l'antisérum. On lave ensuite la résine avec 0.2 M de borate de sodium à pH 9.0, ce qui permet d'éluer les protéines non liées. On centrifuge la résine à 3000 g pendant 5 minutes. On resuspend la résine dans 10 volumes de borate de sodium 0.2 M auquel est ajouté du diméthylpimélimidate à une concentration finale de 20 mM. Le diméthylpimélimidate sert à lier de façon covalente les anticorps à la protéine A de la résine. On incube pendant 30 minutes à 20 °C avec une agitation douce. On arrête la

réaction en lavant avec 0.2 M d'éthanolamine à pH 8.0. L'éthanolamine possède une amine libre très réactive qui va venir neutraliser le diméthylpimélimidate et ainsi arrêter la réaction. On laisse ensuite incuber le mélange pendant 2 heures à 20 °C dans l'éthanolamine 0.2 M. Une fois l'incubation terminée, on centrifuge et on resuspend le gel dans 5 volumes de PBS avec 0.01% de merthiolate comme préservatif. Des aliquotes sont gardées avant et après le couplage pour vérifier s'il a été réussi. Pour ce faire, on fait une électrophorèse de ces aliquotes pour s'assurer qu'il n'y a pas d'immunoglobulines après le couplage. Par la suite, le milieu de culture est concentré d'un volume de 100 ml jusqu'à un volume de 1 ml avec un dispositif Amicon™ (Millipore Co., Nepean, Ontario, Canada) sous une pression d'azote de 55 psi avec une membrane YM10 (MWCO 10 kDa) et dialysé pendant 24 heures contre un tampon PBS pH 7.4 comme décrit à la section 2.2.3. On fait ensuite recirculer le milieu de culture dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique durant toute la nuit à 4 °C afin de lier le maximum de sPLA₂ à l'anticorps. Les protéines non liées à la matrice sont ensuite éluées avec 25 ml de PBS à pH 7.4 suivi de 25 ml de tampon phosphate 10 mM à pH 6.8. L'éluion de l'antigène s'effectue à l'aide d'un tampon glycine à pH 2.6. Le pH des fractions éluées est neutralisé en ajoutant du tampon phosphate 1M à pH 8.0 (1 :10) à chacune des fractions éluées.

2.2.7 Électrophorèse SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western

Les fractions contenant l'activité PLA₂ ont été séparées sur un gel SDS-PAGE de 12 % selon la méthode de Laemmli [172] à 150 V pendant 50 minutes. On transfère ensuite les protéines sur une membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 1 h à 4 °C. Les membranes sont ensuite bloquées toute la nuit à 4 °C avec du PBS à pH 7.4 avec 5 % de lait en poudre. On utilise un antisérum de lapin dirigé contre l'extrémité N-terminale

de la sPLA₂ du groupe IIA comme anticorps primaire à une dilution de 1/500 dans du PBS contenant 5 % de lait en poudre. L'anticorps secondaire est un anti-lapin lié à une peroxydase de raifort (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qué. Can.) utilisé à une dilution de 1/10 000. On visualise la membrane après l'avoir incubée pendant 10 minutes dans du « Supersignal Westpico Enhanced Chemiluminescence Substrate » (Pierce, Rockford, Il.).

2.3 Résultats et Discussion

Aucune des différentes chromatographies n'a permis de purifier les sPLA₂ présentes dans le milieu de culture d'EPR humain à une pureté et en quantité suffisante pour les visualiser sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (sensibilité de 100 ng à 1 µg par bande). Cette dernière condition étant essentielle au séquençage peptidique puisqu'une quantité d'environ 100 ng de protéines est nécessaire à ce type de séquençage. Il est important de mentionner que la purification de sPLA₂ non-pancréatiques à partir d'un tissu ou de milieu de culture de cellules de mammifères n'est pas une pratique commune. Les protocoles pour la purification de sPLA₂ utilisent, dans la presque totalité des cas, du venin de serpent comme matériel de départ [173 , 174 , 175]. Il est important de mentionner que les venins de serpent contiennent environ 10 mg/ml de protéines dont la moitié sont des sPLA₂ [175]. Il est donc beaucoup plus facile de purifier ces sPLA₂ étant donné que la quantité perdue lors de la purification n'est pas vraiment un facteur à considérer. Dans le cas du milieu de culture, la quantité de sPLA₂ dans le milieu est très faible en comparaison au venin de serpent.

2.3.1 Précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Nous avons utilisé cette méthode principalement pour concentrer nos échantillons et aussi pour obtenir une fraction enrichie en sPLA₂. Cette méthode était avantageuse par rapport aux dispositifs de type Amicon que nous avons utilisés pour préparer les échantillons de chromatographie, car ces derniers ne nous permettent pas d'enrichir notre échantillon de départ. De plus, nous avons remarqué que les sPLA₂ ont tendance à coller à ce type de membrane, ce qui occasionne des pertes importantes d'enzyme. Comme on peut le voir au Tableau 2.2 et à la Figure 2.5, on remarque une perte de l'activité spécifique sPLA₂ du surnageant du milieu de culture de l'EPR qui débute à partir de 55 %. Par contre, ce n'est qu'à partir de 60 % que le culot commence à être enrichi en sPLA₂. Comme cette méthode est utilisée principalement pour concentrer les protéines du milieu de culture tout en enrichissant ce dernier en sPLA₂, nous pensons que la fraction la plus propice pour des manipulations subséquentes est le culot précipité avec 70% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Compte tenu de la concentration élevée en protéines de cette fraction ainsi que sa grande activité, cette fraction possède la plus grande quantité de sPLA₂ par ml bien qu'elle ne possède pas l'activité spécifique la plus élevée.

On observe à la Figure 2.5 une augmentation de l'activité spécifique PLA₂ dans le surnageant des trois dernières fractions. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'une PLA₂ contaminante ne précipite qu'à très haute concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et qu'elle reste dans le surnageant alors que les autres protéines du surnageant précipitent, ce qui augmente l'activité spécifique de cette fraction. Par contre, l'activité de ces fractions étant très faible de même que leur concentration en protéines (Tableau 2.2), on assiste à une augmentation de l'activité spécifique.

TABLEAU 2.2 Activité spécifique des différentes fractions de précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Fraction	Activité spécifique (pmol/h/mg)	Fluorescence à 4 min.	Concentration (mg/ml)	Facteur de purification
Milieu contrôle	3498	3554	7.49	1.0
45 % culot	3028	1082	2.63	0.9
45 % surnageant	8204	1806	1.62	2.3
50 % culot	3618	1566	3.19	1.0
50 % surnageant	8399	1639	1.44	2.4
55 % culot	3468	1773	3.77	1.0
55 % surnageant	3769	978	1.91	1.1
60 % culot	5594	2901	3.82	1.6
60 % surnageant	2027	409	1.48	0.6
65 % culot	5721	3209	4.13	1.6
65 % surnageant	1121	205	1.34	0.3
70 % culot	5231	3580	5.04	1.5
70 % surnageant	162	122	5.47	0.0
75 % culot	4369	3385	5.71	1.2
75 % surnageant	1126	85	0.55	0.3
80 % culot	3883	2617	4.97	1.1
80 % surnageant	714	82	0.83	0.2
85 % culot	4193	3113	5.47	1.2
85 % surnageant	1723	81	0.34	0.5

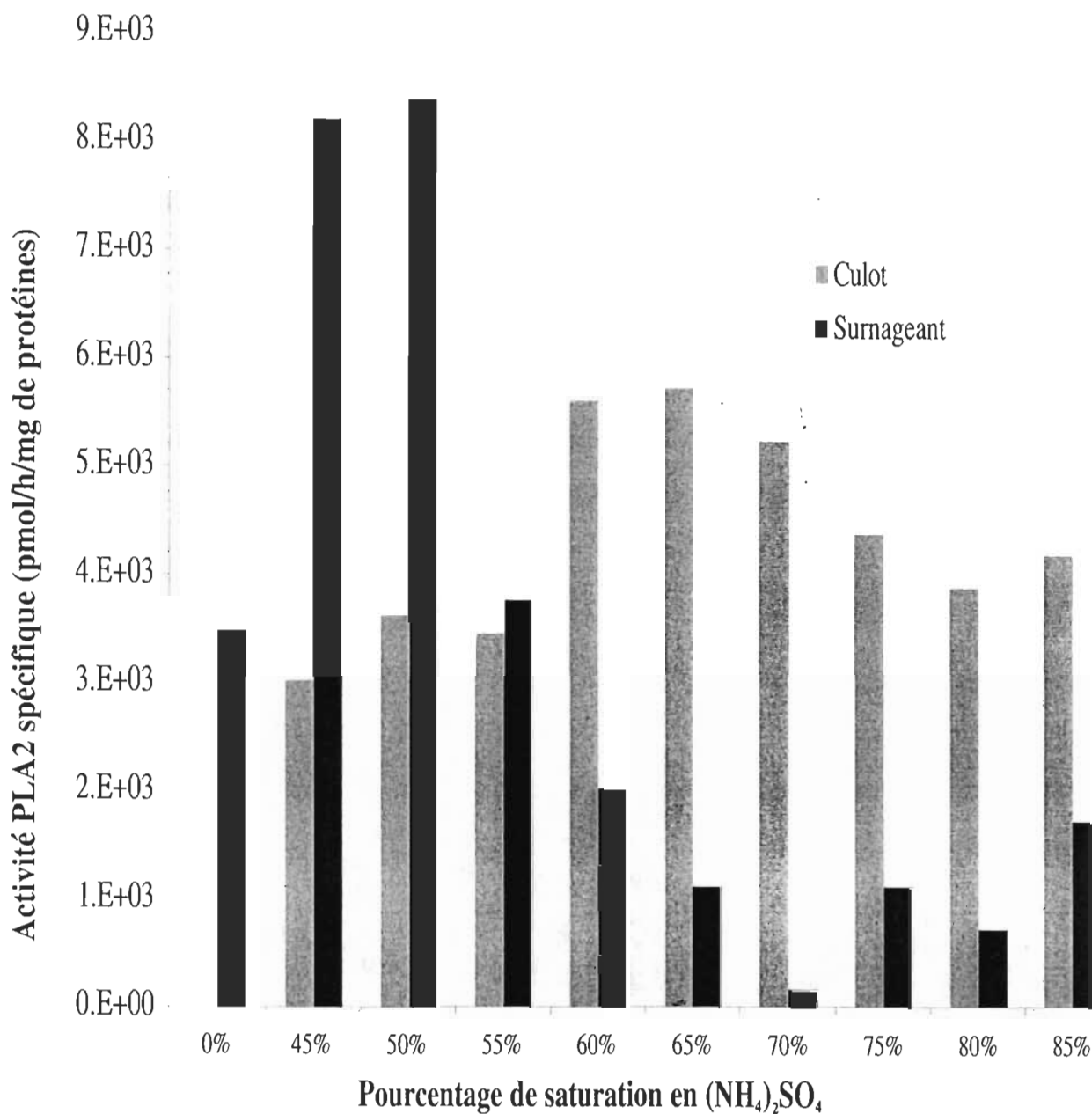


FIGURE 2.5 Précipitation des sPLA₂ du milieu de culture d'EPR humain. L'activité spécifique PLA₂ est exprimée en fonction des différents pourcentages de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. On voit en gris la valeur d'activité spécifique des protéines précipitées dans la culot et en noir, celle des protéines demeurant dans le surnageant. Il est à noter que la valeur de saturation de 0% correspond au milieu de culture avant l'ajout de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.3.2 Chromatographie sur échangeuse de cations

Cette étape de chromatographie a été mise au point par Céline Van Themsche lors de la caractérisation biochimique des PLA₂ des cellules d'EPR humain en culture [169]. Cette chromatographie a d'abord été réalisée avec une petite colonne Hi-Trap SP Sepharose de 1 ml pouvant lier 50 mg de protéines. Le facteur de purification obtenu avec ce type de chromatographie n'est pas très élevé soit de l'ordre de 100 fois (Tableau 2.3). Par contre, cette chromatographie est un moyen efficace d'enlever une bonne partie des protéines contaminantes. On peut voir à la Figure 2.6, le profil d'élution de ce type de chromatographie. Les protéines qui ne se lient pas à la résine sont éluées avec le tampon de liaison à la colonne. Le tampon utilisé (PBS à pH 6.0) doit être à un pH inférieur au point isoélectrique des sPLA₂ (autour de pH 9) afin que les sPLA₂ portent une charge positive globale. On observe dans cette figure une augmentation de l'activité PLA₂ spécifique dans la dernière fraction de lavage de la colonne (fraction 7). À partir de cette fraction, on peut supposer que la colonne devait être saturée et qu'une certaine quantité excédentaire de sPLA₂ a vraisemblablement été éluée sans être retenue par la résine. Les protéines liées à la résine ont ensuite été éluées à l'aide d'un tampon phosphate 50 mM, 2 M NaCl à pH 6.0. La fraction 8 a été déposée sur un gel SDS-PAGE mais les sPLA₂ qu'elle contenait n'ont pas pu être visualisées sur ce gel par coloration au bleu de Coomassie. Cependant, par immunobuvardage de type Western (Figure 2.7), on peut détecter dans le puits 1, la présence d'une bande reconnue par l'antisérum anti-sPLA₂ du groupe IIA située à un haut poids moléculaire, à la limite du gel de séparation et du gel de compression. Ce résultat suggère que les sPLA₂ purifiées suite à cette chromatographie sont agrégées puisqu'on peut observer, dans le puits 2, la sPLA₂ recombinante du groupe IIA sous forme monomérique. Même s'il est possible de supposer que cet agrégat de haut poids moléculaire est riche en sPLA₂,

TABLEAU 2.3 Activité spécifique des différentes fractions de la chromatographie sur échangeuse de cations à partir du milieu de culture des cellules d'EPR humain.

Fraction	Fluorescence 4 min.	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique (pmol/h/mg de protéines)	Facteur de purification
Milieu de culture	323.5	8.76	1646	1.0
1	81	0.25	6577	4.0
2	277	5.73	2092	1.3
3	225	7.29	1267	0.8
4	202	6.96	1154	0.7
5	203.5	5.81	1396	0.8
6	209	1.79	4687	2.8
7	193.5	0.16	47990	29.1
8	417	0.12	168294	102.2

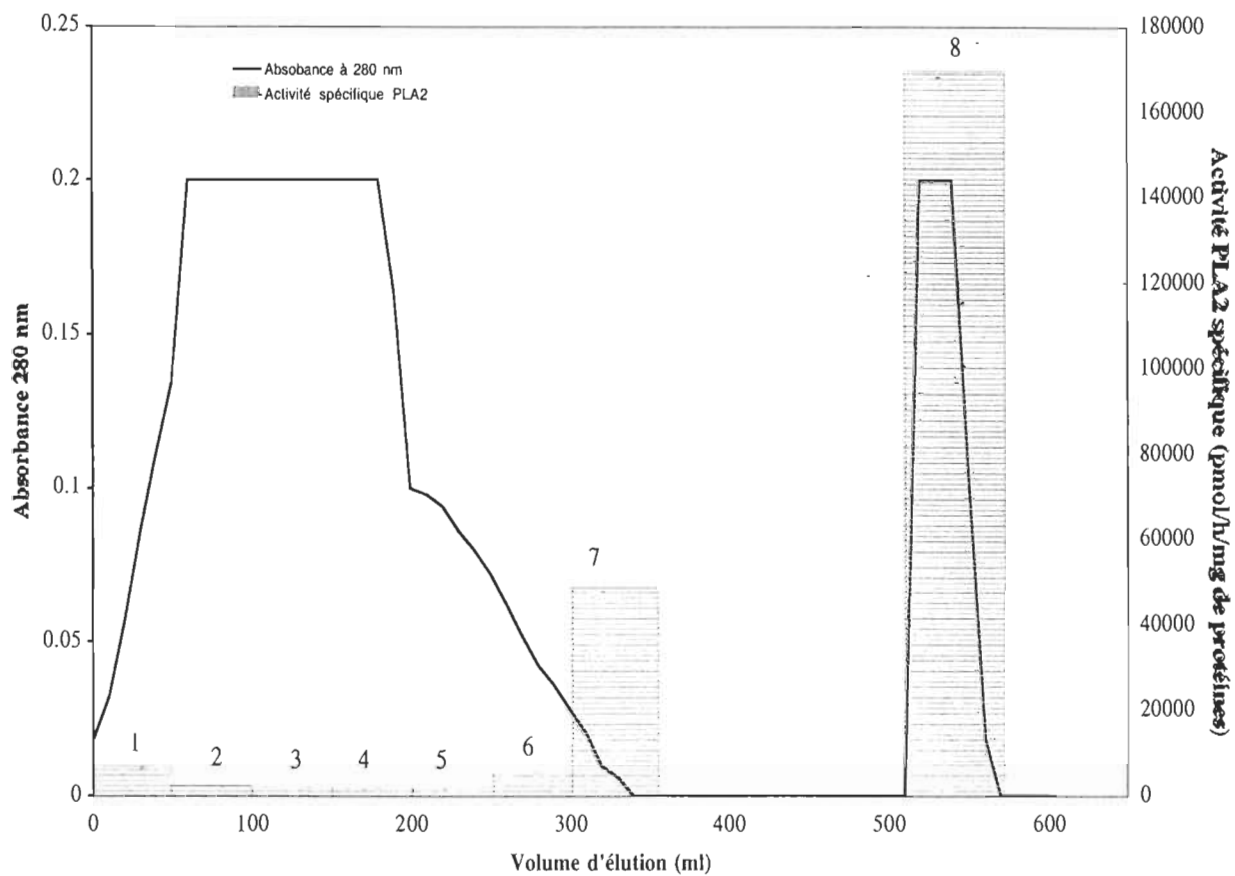


FIGURE 2.6 Profil d'élution des sPLA₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie sur échangeuse de cations.

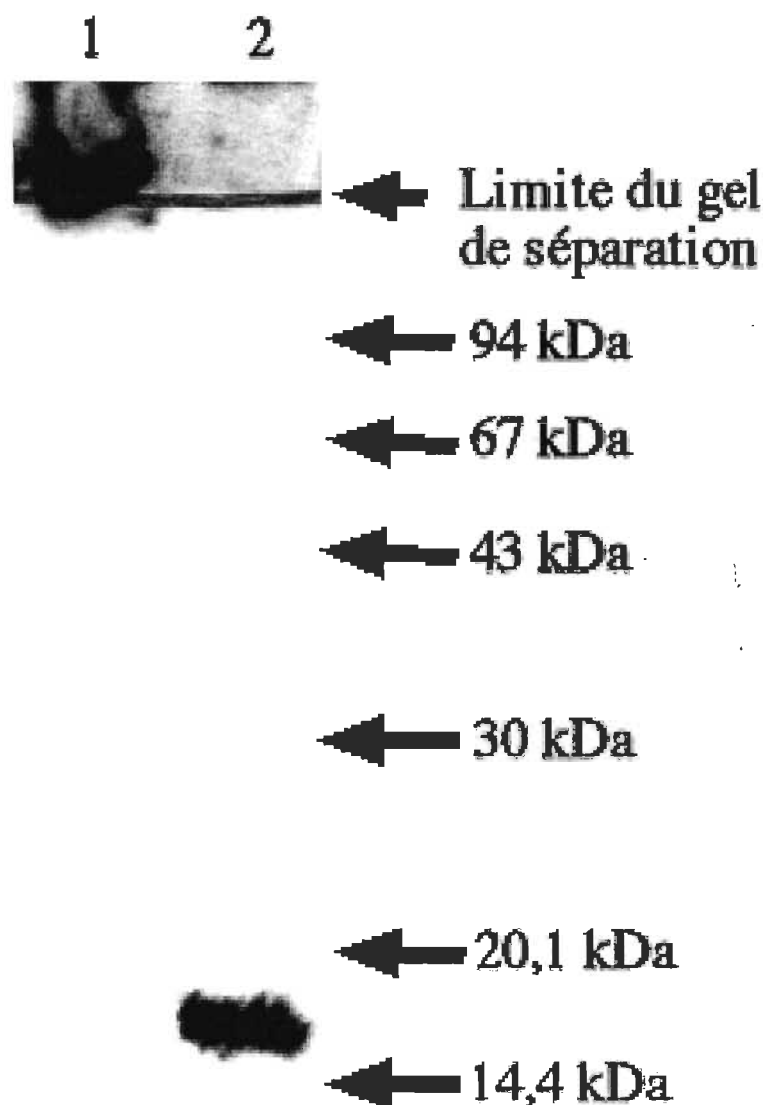


FIGURE 2.7 Immunobuvardage de type Western de la fraction 8 de la chromatographie sur échangeuse de cations (voir Figure 2.6). Le premier puits contient la fraction 8 qui a été dialysée contre du PBS à pH 7.4 pendant 24 heures et concentrée à $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($50\mu\text{g}$ de protéines totales a été déposé sur le gel). Le puits 2 contient 30 ng de sPLA₂ recombinante du groupe IIA comme contrôle positif. Les puits 1 et 2 ont été révélés avec un antisérum dirigé contre les résidus 1-14 en N-terminal de la sPLA₂ humaine du groupe IIA.

la bande de haut poids moléculaire étant reconnue spécifiquement par l'anticorps, il est possible que ces sPLA₂ soient agrégées avec d'autres protéines. L'agrégation des sPLA₂ lors de cette chromatographie peut être due au fait qu'on élue les sPLA₂ liées à la colonne avec un tampon contenant 2M NaCl. Cette condition est toutefois essentielle si on veut que ces protéines se dissocient de la colonne dans un volume minimal. Par contre, l'agrégation peut aussi être due au fait que les protéines totales ont ensuite été concentrées avec un dispositif Amicon avant d'être séparées sur un gel SDS-PAGE. Ce phénomène n'est pas surprenant lorsqu'on concentre des protéines; des collègues de notre laboratoire ont observé des phénomènes semblables avec la sous-unité α de la transducine et RPE65. Pour les sPLA₂, nous devions tenter de les concentrer puisqu'à ce moment nous avions l'intention de les faire séquencer. La technologie disponible à l'époque nécessitait une bande de protéine visualisable sur un gel coloré au bleu de Coomassie. La sPLA₂ de l'EPR semble agréger à plus faible concentration que ce qui est nécessaire pour pouvoir la visualiser sur un gel. Nous sommes certains que cette bande contient des PLA₂ puisque nous détectons une forte activité PLA₂ dans cette fraction et que lorsque nous faisons un immunobuvardage directement avec le milieu nous obtenons une bande à 22 kDa [169].

2.3.3 Chromatographie d'interactions hydrophobes

Ce type de chromatographie a été utilisé auparavant pour purifier une sPLA₂ exprimée par les macrophages [176]. Elle utilise le principe que les sPLA₂ sont des enzymes qui hydrolysent des substrats qui comportent une importante portion hydrophobe. Ce type de chromatographie fait adhérer les protéines à une résine comportant un groupement hydrophobe (ici un phényle) en présence de grandes concentrations de sel (20 % (NH₄)₂SO₄ et 1 M NaCl). Cette chromatographie nous

permet d'enrichir les sPLA₂ par un facteur d'environ 100 fois (Tableau 2.4). L'élution se fait en diminuant la force ionique de la phase mobile de la chromatographie avec de l'eau. On peut voir au Tableau 2.4 et à la Figure 2.8 que l'élution se fait en deux parties. Le premier pic d'activité PLA₂ est élué entre 10 et 0 % de (NH₄)₂SO₄ et le deuxième pic d'élution sort à partir de 0 %. Les fractions de chacun des pics d'élution (fractions 36 à 100 ml et 101 à 200 ml) ont été regroupées et déposées sur gel. On peut voir à la Figure 2.9 que l'antisérum anti-sPLA₂ du groupe IIA reconnaît des protéines de haut poids moléculaire qui sont restées dans le haut du gel. Comme à la section 2.3.2, on peut supposer que les sPLA₂ se sont agrégées dans le haut du gel. Il est possible que les protéines se soit agrégées parce que les groupements plus hydrophobes de ces PLA₂ s'associent très fortement à faible force ionique pour ne plus se dissocier par la suite. Ce qui est curieux dans ce phénomène, c'est qu'on n'observe pas la présence de plusieurs populations de sPLA₂. En effet, on pourrait penser observer la présence de dimères, trimères et multimères de cette protéine. Il semble cependant qu'elle ne forme que de gros agrégats de très haut poids moléculaire. On peut supposer que les anticorps reconnaissent spécifiquement les sPLA₂ de cette bande puisque ce type d'agrégation résulte possiblement de l'interaction entre les groupements hydrophobes de ces protéines, les acides aminés reconnus par l'anticorps sont probablement encore disponibles à la surface des agrégats puisqu'ils sont majoritairement hydrophiles.

2.3.4 Chromatographie d'affinité

Étant donné que nous disposons de quantités importantes d'un antisérum qui reconnaît fortement la sPLA₂ du milieu de culture des cellules d'EPR (voir Figure 2.1), nous l'avons utilisé pour la chromatographie d'affinité par le biais des interactions

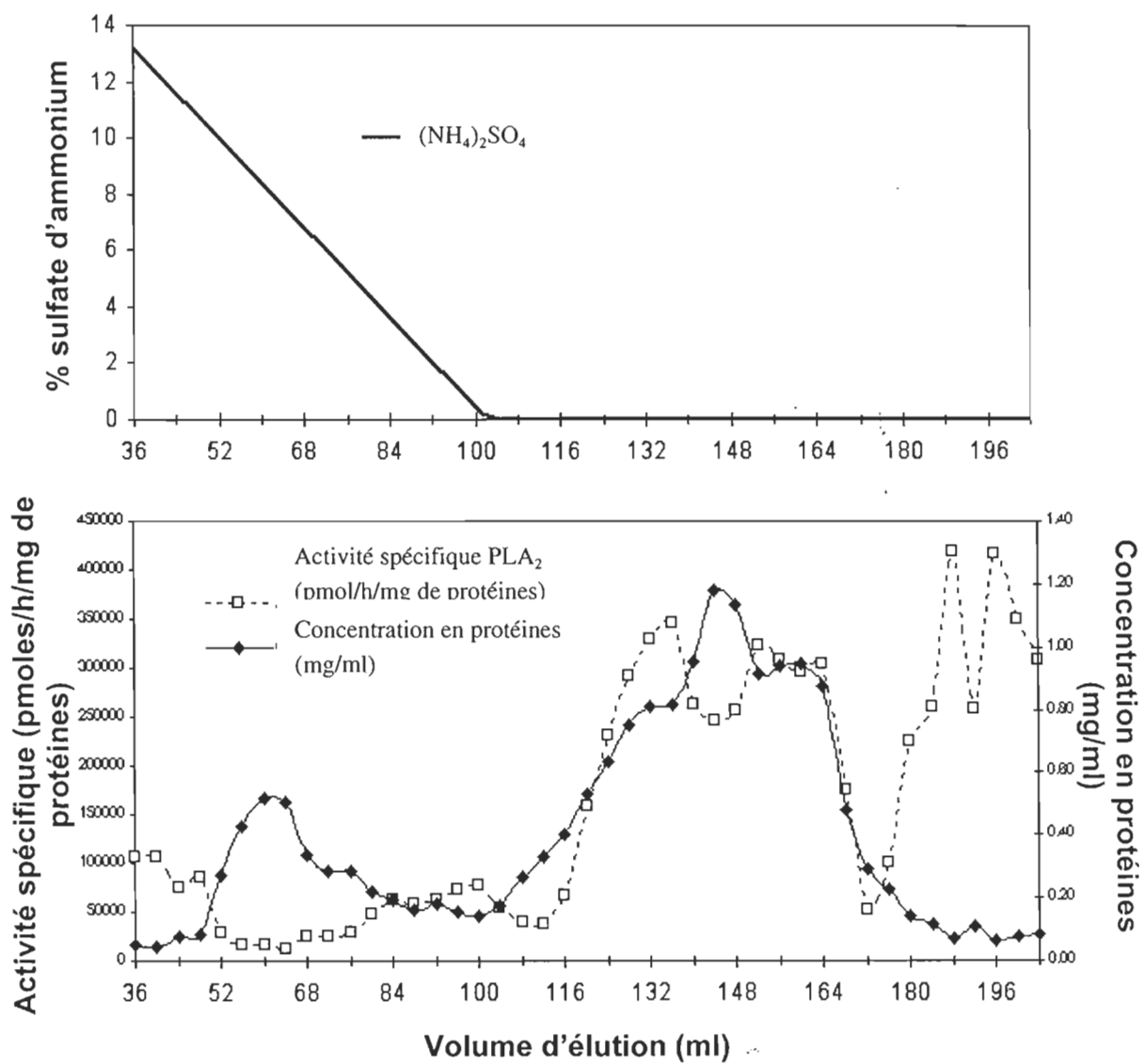


FIGURE 2.8 Profil d'élution des sPLA₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie d'interactions hydrophobes.

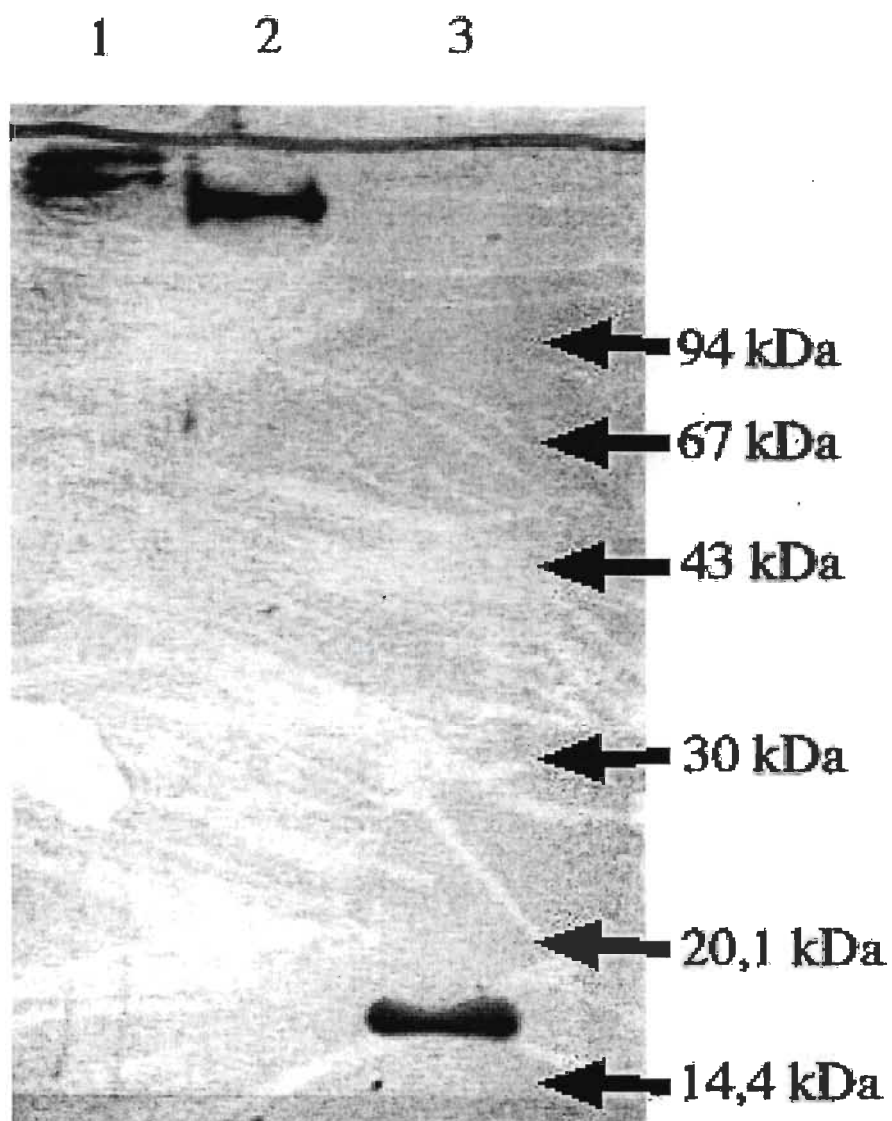


FIGURE 2.9 Immunobuvardage de type Western des fractions purifiées par chromatographie d'interactions hydrophobes. Puits 1, fractions d'élution de 36 à 100 ml (50 μ g de protéines totales). Puits 2, fractions d'élution de 101 à 200 ml (50 μ g de protéines totales). Puits 3, sPLA₂ recombinante du groupe IIA (30 ng). Les puits A, B et C ont été révélés avec un antiserum dirigé contre les résidus 1-14 en N-terminal de la sPLA₂ humaine du groupe IIA.

antigène-anticorps. Nous avons donc lié les anticorps de l'antisérum à une résine Sepharose-protéine-A afin qu'ils soient orientés de façon optimale pour lier l'antigène (sPLA₂). On peut voir au Tableau 2.5 et à la Figure 2.10 que cette chromatographie nous donne d'excellent rendements de purification des sPLA₂ du milieu de culture de l'ordre de 500 à 1000 fois. Les fractions de lavage (lavages 1 à 5), de pré-élution (pré-élutions 1 à 6) et d'élution (élutions 1 à 11) ont été regroupées pour donner trois grandes fractions, lesquelles ont ensuite été concentrées et déposées sur un gel SDS-PAGE. On peut voir à la Figure 2.10 sur le graphique représentant le profil d'élution des sPLA₂, qu'à chacune des étapes d'élution (lavage, pré-élution et élution), des sPLA₂ se dissocient de la colonne. Toutes ces fractions sont hautement enrichies en sPLA₂. La Figure 2.11B montre deux bandes de protéines qui sont reconnues par l'antisérum dans les puits 2, 3 et 4. La première bande possède un poids moléculaire de 55 kDa. On peut aussi voir cette bande sur le gel coloré au bleu de Coomassie à la Figure 2.11A. Cette protéine n'est pas une sPLA₂ mais probablement une chaîne lourde d'anticorps. Il est donc possible que les divers tampons de lavage et d'élution ont provoqué la dissociation des anticorps anti-sPLA₂ liés à la colonne. Ces anticorps ont ensuite été détectés par l'anticorps secondaire polyclonal anti-immunoglobuline de lapin lors de l'immunobuvardage. Il est cependant surprenant de constater que les chaînes légères de ces anticorps ne sont pas détectées par l'anticorps secondaire puisqu'on détecte une bande de même poids moléculaire qu'on peut visualiser en coloration au Coomassie (voir Figure 2.11A). On peut voir une autre bande qui possède un poids moléculaire supérieur à 100 kDa et se situe dans le haut du gel. On peut aussi détecter cette bande par coloration au bleu de coomassie (Figure 2.11A). Celle-ci est très fortement reconnue par l'anticorps dirigé contre la sPLA₂ du type IIA. On peut penser que cette bande correspond à des sPLA₂ qui, sont agrégées

TABLEAU 2.5 Activité spécifique des différentes fractions de chromatographie d'affinité à partir du milieu de culture des cellules d'EPR humain.

Fraction	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique (pmol/h/mg de protéines)	Facteur de purification
Milieu concentré	58,760	55	1
1	0,220	1976	35,8
2	4,610	187	3,4
3	6,170	104	1,9
4	1,320	382	6,9
5	2,440	460	8,3
6	14,630	70	1,3
7	4,570	196	3,6
8	1,410	420	7,6
9	0,660	681	12,3
10	0,520	808	14,6
11	0,290	1465	26,5
12	0,520	562	10,2
13	0,240	1566	28,4
14	0,190	1745	31,6
15	0,210	1579	28,6
16	0,210	1555	28,2
17	0,130	2475	44,8
18	0,110	2835	51,4
19	0,100	3168	57,4
20	0,110	2970	53,8
21	0,110	2970	53,8
22	0,060	5280	95,6
23	0,080	4267	77,3
24	0,060	5280	95,6
25	0,040	8412	152,4
26	0,040	7675	139,0
30	0,020	15349	278,0
31	0,020	9942	180,1
32	0,010	20376	369,1
33	0,010	20376	369,1
Lavage 1	0,198	24490	443,6
Lavage 2	0,017	38588	698,9
Lavage 3	0,008	48205	873,1
Lavage 4	0,005	62381	1129,9
Lavage 5	0,003	108884	1972,2
Pré-élution1	0,015	21121	382,6
Pré-élution2	0,008	37759	683,9
Pré-élution3	0,031	9903	179,4
Pré-élution4	0,018	18147	328,7
Pré-élution5	0,024	12586	228,0
Pré-élution6	0,013	25883	468,8
Élution 1	0,015	19155	347,0
Élution 2	0,021	12980	235,1
Élution 3	0,123	40822	739,4
Élution 4	0,095	28586	517,8
Élution 5	0,068	15792	286,0
Élution 6	0,063	10413	188,6
Élution 7	0,054	8234	149,1
Élution 8	0,055	7369	133,5
Élution 9	0,066	5396	97,7
Élution 10	0,087	4094	74,1
Élution 11	0,073	2859	51,8

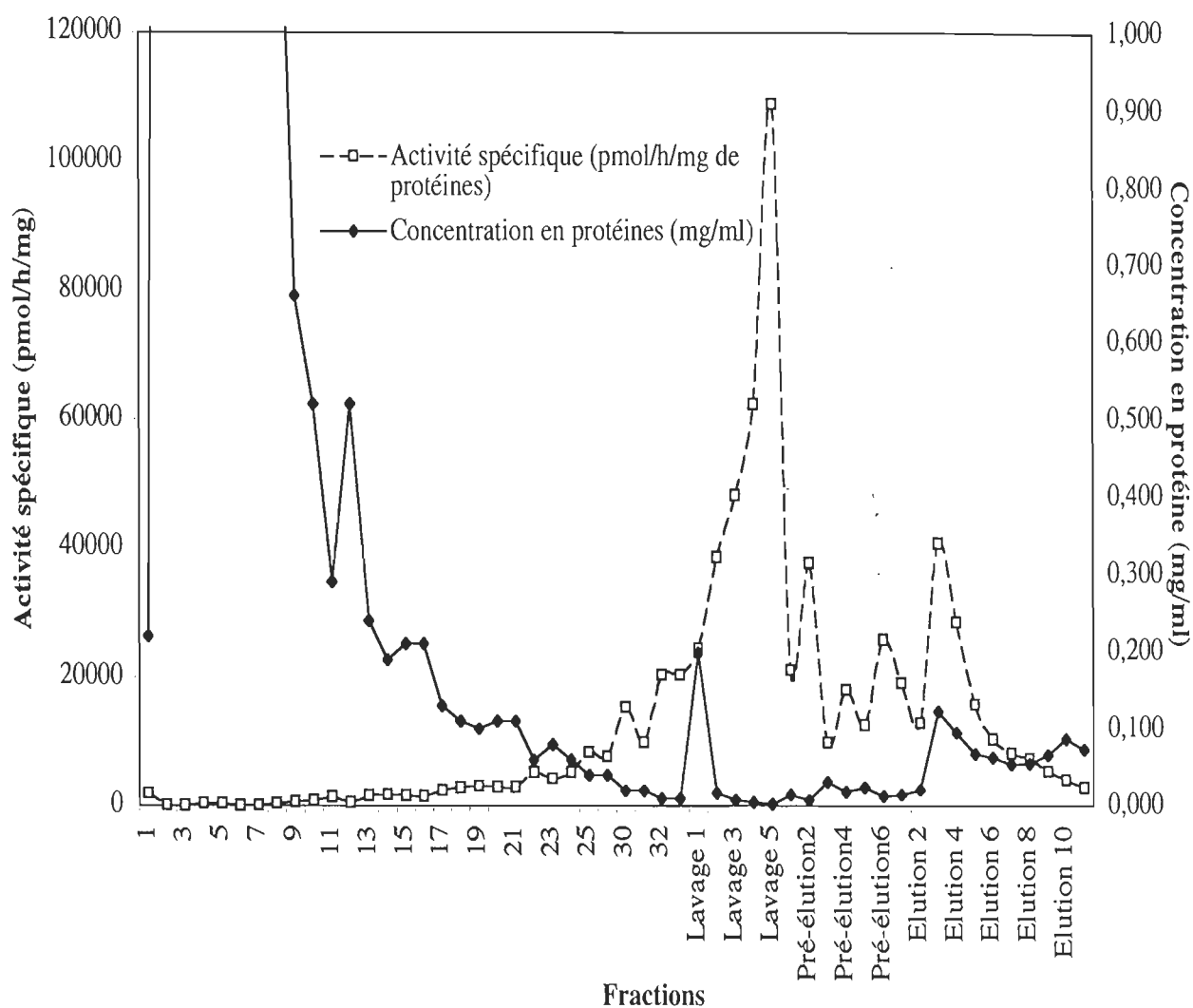


FIGURE 2.10 Profil d'élution des sPLA₂ du milieu de culture de cellules d'EPR humain par chromatographie d'affinité. Les fractions ont un volume de 1 ml. Les fractions 1 à 33 correspondent au milieu de culture élué de la colonne. Les fractions de lavage 1 à 5 ont été éluées avec un tampon PBS à pH 7,4. Les fractions de pré-élution 1 à 6 ont été éluées avec un tampon phosphate de sodium 10 mM à pH 6,8. Un tampon glycine à pH 2,6 a été utilisé pour éluer les dernières fractions d'élution 1 à 11.

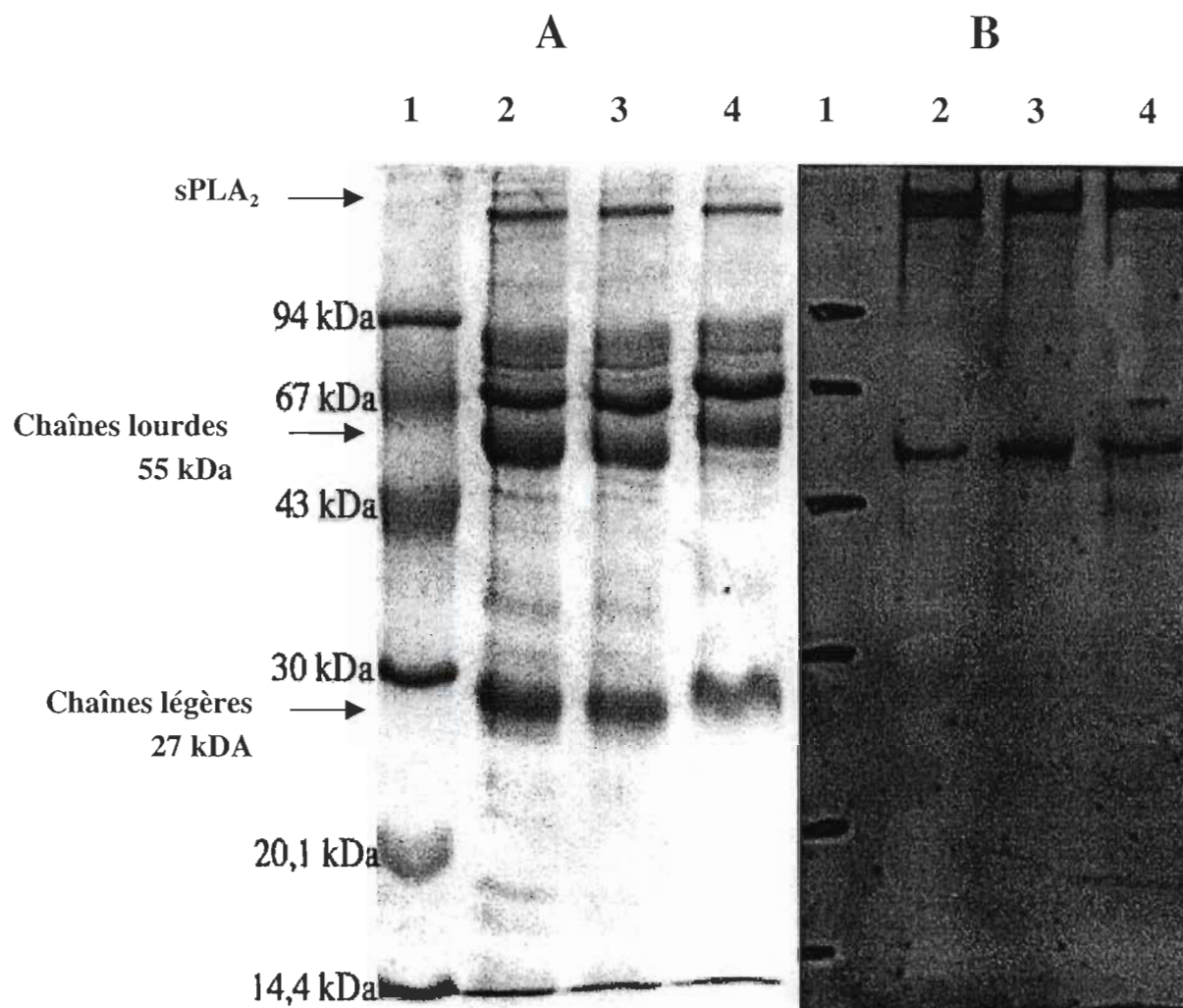


FIGURE 2.11 Électrophorèse (A) et immunobuvardage de type Western (B) avec les fractions obtenues lors de la chromatographie d'affinité. Les puits 1, 2, 3 et 4 contiennent respectivement les standards de poids moléculaire, les fractions de lavage, les fractions de pré-élution et les fractions d'élution. Environ 15 µg de protéines totales ont été chargés dans les puits 2, 3 et 4. Les puits 2,3 et 4 ont été révélés avec un antisérum dirigé contre les résidus 1-14 en N-terminal de la sPLA₂ humaine du groupe IIA (B).

ensembles comme pour les autres types de chromatographie. Toutefois, contrairement aux autres chromatographies, cette bande de protéine a pénétré dans le gel et n'est pas restée à l'interface des gels de compression et de séparation. Les sPLA₂ des fractions enrichies de la chromatographie d'affinité semblent s'agréger de façon irréversible suite à leur séparation. Il est possible que cela soit imputable aux conditions d'élution difficiles (ici avec un pH de 2,6). Ce type de chromatographie est reconnue pour bien fonctionner lorsqu'on utilise des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre la protéine d'intérêt à purifier. Par contre, nous étions conscients que notre antisérum contenait des anticorps qui n'étaient pas spécifiquement dirigés contre les sPLA₂ ainsi que d'autres protéines, ce qui diminuait la capacité de notre colonne à lier des quantités importantes de sPLA₂.

2.4 Discussion générale sur les purifications

Généralement, on peut dire que les chromatographies utilisées permettaient d'obtenir des fractions fortement enrichies. Cependant, il nous a été impossible d'enrichir suffisamment ces sPLA₂ pour les visualiser sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. L'objectif visé par ces expériences était de purifier partiellement les sPLA₂ pour faire un séquençage peptidique de ces protéines à partir d'une bande prélevée d'un gel SDS-PAGE. Au moment de réaliser ces purifications, nous pensions avoir affaire à une toute nouvelle sPLA₂ puisque son poids moléculaire obtenu en immunobuvardage de type Western (voir Figure 2.1) montrait une protéine de 22 kDa (au lieu de 22 kDa) reconnue fortement par un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de la sPLA₂ du groupe IIA et faiblement par un anticorps dirigé contre la sPLA₂ groupe IB. Nous n'avons pas poursuivi les purifications plus loin parce qu'une approche par RT-PCR (chapitre 3) s'est avérée plus fructueuse.

Les immunobuvardages de type Western montrent une bande de très haut poids moléculaire qui est reconnue par l'anticorps anti-séquence N-terminale du groupe IIA. Cette bande pourrait correspondre à un agrégat de protéines fortement enrichi en sPLA₂. Deux phénomènes pourraient expliquer la formation de cet agrégat. Premièrement, les conditions d'élution que nous avons utilisées lors des chromatographies étaient très stringentes (pH 2.6, force ionique très élevée, élution avec de l'eau). Il se peut que ces conditions aient dénaturé les sPLA₂ de façon irréversible. La dialyse des fractions de chromatographie pour remettre les sPLA₂ dans un tampon PBS avant de faire le test d'activité PLA₂ de même que l'observation de valeurs d'activité assez élevées suggèrent que ces protéines ne sont pas dénaturées et/ou agrégées, du moins pas de façon irréversible. Deuxièmement, il est connu que certaines sPLA₂ ont tendance à former des multimères lors de leur cristallisation [177, 178]. Il est donc possible que ces enzymes s'organisent en multimères à partir d'une certaine concentration critique, ce qui pourrait mener à leur agrégation [178].

Sur les bases de l'expérience que nous avons acquise, nous pourrions optimiser les conditions de purification et de récupération des sPLA₂ de deux façons. Premièrement, lors de la chromatographie d'affinité, nous pourrions fixer sur la résine des anticorps purifiés, poly- ou monoclonaux. Comme l'antisérum que nous possédons fonctionne très bien en immunobuvardage Western, nous pourrions l'utiliser pour purifier les anticorps spécifiques à la sPLA₂ avec une colonne sur laquelle est fixée des sPLA₂ recombinantes de type IIA. De cette façon, nous pourrions fabriquer une colonne où seulement les anticorps de l'antisérum spécifique aux sPLA₂ y seraient liés. Deuxièmement, il faudrait trouver des conditions empêchant l'agrégation des sPLA₂ du milieu de culture à haute concentration, ce qui permettrait de les visualiser sur un gel.

CHAPITRE 3

CLONING OF THE PHOSPHOLIPASES A₂ EXPRESSED BY THE HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

**Soumis à :
Investigative Ophthalmology & Visual Science**

**CLONING OF THE PHOSPHOLIPASES A₂ EXPRESSED BY THE
HUMAN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM**

Marc-André LAURIN, Vicky BEAUDOIN, Christian SALESSE

GREIB, Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-
Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

3.1 Abstract

Purpose. Clone and sequence the phospholipases A₂ (PLA₂) expressed by human retinal pigmented epithelial (RPE) cells. **Methods.** Primers for known PLA₂s were assayed by RT-PCR using RNA extracted from RPE prepared from human eye donors to specifically amplify the transcript of these proteins. The PCR products were cloned and sequenced and their identity was confirmed using the NCBI data bank. **Results.** Human RPE cells express secreted PLA₂s of group IIA and group V as well as the cytosolic PLA₂ gamma which is a member of the group IV PLA₂. **Conclusions.** RPE cells express three known phospholipases A₂, i.e. two different secreted PLA₂ (sPLA₂) and one cytosolic PLA₂ (cPLA₂). Indeed, the sequence of both group V sPLA₂ and cPLA₂ gamma corresponds to the published sequence of these enzymes. However, given that we could not obtain the sequence of group IIA sPLA₂ downstream of its catalytic site using different primers designed to amplify the full sequence of this enzyme, we conclude that human RPE cells express an isoform of group IIA sPLA₂.

3.2 Introduction

RPE cells are responsible for the shedding and phagocytosis of the outer segments of retinal photoreceptors (for a review, see [1]). The ingested phagosomes will then be hydrolyzed by enzymes of RPE cells such as PLA₂s. These ubiquitous enzymes play crucial roles in normal cellular functions by participating in the metabolism and turnover of phospholipids [2, 3]. PLA₂s constitute a diverse family of enzymes that

hydrolyze the *sn*-2 fatty acyl ester bond of phosphoglycerides, producing free fatty acids and lysophospholipids.

PLA₂s should be particularly important for the physiology of photoreceptors since their outer segments contain very high amounts of polyunsaturated fatty acids. Indeed, bovine rod outer segments contain more than 50% docosahexaenoic acid (22:6w3) [4, 5] which are located at position *sn*-2 of these phospholipids [6]. It was shown that the rat retina strives to maintain a constant proportion of docosahexaenoic acid [7]. PLA₂s from RPE cells could thus be used to specifically hydrolyze and recycle these highly unsaturated fatty acids to photoreceptor inner segments.

There are numerous types of PLA₂. They have been isolated from different sources and classified into three major groups: secretory PLA₂ (sPLA₂), cytosolic PLA₂ (cPLA₂), and Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂). There are six subgroups of sPLA₂ in mammals: groups IB, II (A, C, D, E and F), V, X and XII. Except for group VIIA, sPLA₂s are typically small proteins (\approx 14 kD) which contain multiple disulfide bridges. In addition, they all use a catalytic histidine and need mM Ca²⁺ concentrations for hydrolysis [8, 9]. cPLA₂s, which are also called group IV PLA₂, are subdivided into three subgroups: cPLA₂ α , cPLA₂ β and cPLA₂ γ . They are much larger than the sPLA₂s (61-114 kD) and use a catalytic serine instead of a histidine [10, 11]. These three cPLA₂ isoforms contain two homologous domains named A and B which are interspaced with a sequence specific to each isoform. cPLA₂ α and β contain an amino-terminal domain called C2 that has been shown to be involved in their Ca²⁺-dependent binding to membranes. In contrast, cPLA₂ γ lacks this C2 domain and, accordingly, it is calcium-independent [12, 13]. cPLA₂ β has additional domains next to the C2 domain, making this protein the largest one in this group IV. iPLA₂, or group VI PLA₂, like the other

cPLA₂s, uses the same catalytic nucleophilic serine but are not dependent on Ca²⁺ for membrane binding.

We have previously shown that PLA₂ activity can be measured in bovine RPE cells [14] and these PLA₂s showed different biochemical characteristics than known PLA₂s [15]. More recently, we have evaluated the sensitivity to different treatments of partially purified PLA₂s from human RPE cells and performed immunoblot experiments [16]. These results suggested that human RPE cells probably contain two novel types of intracellular PLA₂ enzymes, one of them being similar to a bovine intracellular RPE-PLA₂ recently identified [15], and that cultured human RPE cells secrete a sPLA₂ enzyme. In the present paper, we present our results on the cloning of the types of PLA₂ expressed by human RPE cells.

3.3 Methods

3.3.1 Extraction Of RNA From RPE Cells And Amplification Of Different PLA₂s

Human eyes were obtained from the National Eye Bank Inc. (Sainte-Foy, Que.). The eyes were dissected to collect the RPE cells as described by Van Tamsche et al. [16]. RPE cells were either cultured as described [16] or used immediately. RPE cells were kept on ice prior to RNA extraction. Total RNA was extracted from fresh or cultured RPE cells according to the method developed by the group of Chomczynski [17, 18] (Tri Reagent, Sigma Co., St-Louis, MO). The quality of total RNA was subsequently verified on agarose gel. The RNA was transformed in cDNA using the

SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Burlington, Ont) using 5 µg of total RNA. PCR reactions were performed at 55 °C for 35 cycles. Elongation times were 1 and 3 minutes for sPLA₂ and cPLA₂, respectively. The reaction mixture contained 2 µL of cDNA template, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase, and 10 % DMSO, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix as well as 0.5 mM of each NMT primer in a total volume of 50 µL. The primers used for known secreted and cytosolic PLA₂s are presented in Table 3.1. The primers were synthesized with a DNA Synthesizer ABI-394 from Applied Biosystem Inc. by the Service de synthèse of the centre de recherche du CHUL (Ste-Foy, Québec). Positive controls for the primers used in Table 3.1 are presented in Figure 3.2 in the annexes.

3.3.2 Cloning Of Human RPE PLA₂s

The PCR products were then separated by electrophoresis on 1% agarose gel in TBE and the bands of interest were extracted and purified with Ultrafree-DA columns (Millipore Co, Bedford, Mass.). These bands were then cloned into pGEM-T easy cloning vector (Promega Co, Madison, WI) and then transformed into *E. coli* DH5α strain. Plasmid purification was performed with the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Laval, Que.) followed by an Eco R1 (New England Bio-Labs, Mississauga, ON, Canada) digestion to select positive clones which were then sent for sequencing (SUCOF, Ste-Foy, Que.) using T7 and SP6 sequencing primers.

3.4 Results

Groups IB, IIC-F, X and XII sPLA₂ as well as cPLA₂ α and cPLA₂ β could not be amplified by RT-PCR using RNA extracted from human RPE cells. In fact, bands have been obtained, but after cloning and sequencing, they were shown to correspond to other types of proteins which, thus, strongly suggests that these enzymes are not expressed by RPE cells. Figure 3.1A presents the electrophoresis of the PCR products prepared using primers for group IIA (gIIA) and group V (gV) sPLA₂s. It can be seen that the strongest bands migrated to a position which is in very good agreement with the number of base pairs calculated on the basis of the designed primers (see Table 3.1). Indeed, gIIA and gV sPLA₂s migrated to ~ 300 and 550 bp, respectively. Sequencing of these bands revealed the presence of both gIIA and gV sPLA₂s (Figure 3.3 and 3.4 of the annexes). These sequences possess 100% homology with the known sequences for these sPLA₂. However, only the sequence upstream of the catalytic site (H48 and D49) of gIIA sPLA₂ could be amplified. Other primers designed downstream the catalytic site failed to amplify either part or the full sequence of gIIA sPLA₂. These results suggest that RPE cells express an isoform of the gIIA sPLA₂. In contrast, the entire cDNA of gV PLA₂ was successfully amplified with a polymorphism substitution on the allele 140 (T140C) [19].

Figure 3.1B shows the electrophoresis of the PCR products prepared using primers for cPLA₂ γ. The strong band located at ~1500 bp corresponds very well to the number of base pairs calculated from the primers (Table 3.1) and the known sequence of this enzyme. Cloning and sequencing of this band showed 100% homology with the known cPLA₂γ.

3.5 Discussion

The results of the specific amplification of PLA₂s by RT-PCR show the presence of transcripts of gIIA and gV sPLA₂s as well as cPLA₂ γ in RPE cells. We have obtained the complete coding sequence for gV sPLA₂ as well as cPLA γ, whereas only a partial clone for gIIA was obtained from the N-terminal up to the conserved amino acid (H48 and D49) in the catalytic region. Attempts to amplify gIIA downstream of this catalytic region failed. We thus propose in agreement with previous results [15, 16, 20] that an isoform of gIIA sPLA₂ could be present in RPE cells. The amplification of the complete sequence of gIIA is in progress.

The results presented here partly contrast with our previous conclusions on the PLA₂ content of human RPE cells [16]. Indeed, on the basis of the sensitivity of different PLA₂-active fractions eluted from cation-exchange chromatography to para-bromophenacylbromide (pBPPB), Ca²⁺/EGTA, DTT, heat and H₂SO₄, we had concluded that human cultured RPE cells probably contain two different intracellular PLA₂ enzymes. In addition, we had performed immunoblot experiments where no cross-reactivity was observed between the RPE intracellular PLA₂ enzymes and several antisera directed against sPLA₂ and cPLA₂, and thus concluded that intracellular RPE PLA₂s are different from well known secretory, cytosolic and Ca²⁺-independent PLA₂s. However, only antibodies against cPLA₂ α were assayed as antibodies against cPLA₂ β and cPLA₂ γ are not commercially available. In fact, the most striking difference between these data and the present results is that cPLA₂ γ is calcium-independent [12, 13] whereas we have previously demonstrated that intracellular PLA₂ from RPE cells are calcium dependent [15, 16]. It can thus be concluded that other types of intracellular

PLA₂ should be expressed by human RPE cells and that these enzymes could be novel types of intracellular PLA₂ enzymes.

We also previously reported an additional RPE PLA₂ enzyme that was secreted and which exhibited sensitivity to pBPB, Ca²⁺/EGTA, DTT, heat and H₂SO₄ which are characteristic of sPLA₂ enzymes [16]. This sPLA₂, with an apparent molecular weight of approximately 22 kDa, cross-reacted weakly with an antiserum directed against porcine pancreatic group I sPLA₂ but strongly with an antiserum directed against N-terminal residues 1-14 of human synovial group II sPLA₂ (now called group IIA sPLA₂), which suggested that this extracellular enzyme was a member of the sPLA₂ class of enzymes [16]. These data are in good agreement with the present finding of the expression of a group IIA sPLA₂ in RPE cells. In addition, our previous observation of a molecular weight of 22 kD for this enzyme [16] agrees well with the fact that we could not amplify by PCR the full sequence of this enzyme when using primers designed on the basis of the known sequence of this group of sPLA₂ and supports our conclusion that this sPLA₂ is an isoform of the known gIIA sPLA₂. Moreover, the present observation of the expression of an additional sPLA₂, namely a gV sPLA₂, by RPE cells could not be documented in our previous report [16] as antibodies against this enzyme became only very recently available.

It is very interesting to note that RPE cells express sPLA₂ enzymes which they could be involved in the phagocytosis of photoreceptor outer segments by RPE. Indeed, it was previously shown that the M-type receptor, which is closely related to mannose receptors [21], is involved in the phagocytosis process in macrophages and is also present in the plasma membrane of RPE cells [22, 23]. Moreover, it has been demonstrated that binding of different types of sPLA₂ to M-type receptor leads to the activation of

phagocytosis [24, 25]. It can thus be proposed that gIIA or gV sPLA₂s or both could be involved in the phagocytosis of photoreceptor outer segments (POS) by RPE cells. In addition, it was shown that pretreatment of POS with gIIA sPLA₂ increases the rate of disk membrane/plasma membrane fusion by five-fold, in a dose-dependent manner [26]. This fusion is critical to the formation of disk membrane packets at the distal end of the POS, prior to their phagocytosis by RPE cells. Furthermore, it has been demonstrated that gIB, gIIA and gV sPLA₂s induce activation of cPLA₂ γ [27, 28] which could also take place in RPE cells and be responsible for POS phagocytosis. The exact role of gV sPLA₂ is not fully understood but it might be related and complementary to gIIA sPLA₂ [29].

3.6 Acknowledgements

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds FCAR and the Fondation des maladies de l'œil for financial support. C.S. is a Chercheur boursier senior of the Fonds de la recherche en santé du Québec. V.B. is indebted to the Fonds FCAR for a scholarship. We are thankful to the National Eye Bank Inc. (Ste-Foy, Québec) for providing us with human eyes.

3.7 References

1. Besharse, J. C. and Defoe, D. M., "Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F. and Wolfensberger, New York, 152-172 (1998)
2. Waite, M., "The phospholipases.", *Dans Handbook of lipid research*, Hanahan, D. J., Plenum, New York, (1998)
3. van den Bosch, H., "Intracellular phospholipases A", *Biochim Biophys Acta* 604: 191-246. (1980)
4. Salesse, C., *et al.*, "An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes", *Anal Biochem* 142: 258-66. (1984)
5. Stone, W. L., *et al.*, "A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments", *Exp Eye Res* 28: 387-97. (1979)
6. Anderson, R. E. and Sperling, L., "Lipids of ocular tissues. VII. Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments", *Arch Biochem Biophys* 144: 673-7. (1971)
7. Tinoco, J., *et al.*, "Depletion of docosahexaenoic acid in retinal lipids of rats fed a linolenic acid-deficient, linoleic acid-containing diet", *Biochim Biophys Acta* 486: 575-8. (1977)
8. Dennis, E. A., "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2", *J Biol Chem* 269: 13057-60. (1994)
9. Six, D. A. and Dennis, E. A., "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization", *Biochim Biophys Acta* 1488: 1-19. (2000)
10. Clark, J. D., *et al.*, "A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)- dependent translocation domain with homology to PKC and GAP", *Cell* 65: 1043-51. (1991)

11. Nalefski, E. A., *et al.*, "Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain", *J Biol Chem* 269: 18239-49. (1994)
12. Underwood, K. W., *et al.*, "A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2", *J Biol Chem* 273: 21926-32 (1998)
13. Pickard, R. T., *et al.*, "Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 274: 8823-31. (1999)
14. Jacob, M., *et al.*, "Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments", *J Biol Chem* 271: 19209-18 (1996)
15. Jacob, M., *et al.*, "Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipase A2", *Biochem J* 327: 455-60 (1997)
16. Van Themsche, C., *et al.*, "Human retinal pigment epithelium secretes a phospholipase A2 and contains two novel intracellular phospholipases A2", *Biochem Cell Biol* 79: 1-10 (2001)
17. Chomczynski, P. and Sacchi, N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction", *Anal Biochem* 162: 156-9. (1987)
18. Chomczynski, P., "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples", *Biotechniques* 15: 532-4, 536-7. (1993)
19. NCBI, "Nucleotide sequences database Nucleotide sequences database XM_001841", Uniform Resource Location http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=2020887, october 4, 2001.
20. Jacob, M., *et al.*, "Phospholipases A2 of rod outer segment-free bovine retinae are different from well-known phospholipases A2", *Biochim Biophys Acta* 1391: 169-80 (1998)

21. Nicolas, J. P., *et al.*, "Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180-kDa membrane receptor", *J Biol Chem* 270: 28869-73 (1995)
22. Wilt, S. D. and McLaughlin, B. J., "Is another mannose receptor-like lectin present in retinal pigment epithelium?", *Curr Eye Res* 19: 1-3 (1999)
23. Wilt, S. D., *et al.*, "Mannose receptor is expressed in normal and dystrophic retinal pigment epithelium", *Exp Eye Res* 69: 405-11 (1999)
24. Zvaritch, E., *et al.*, "Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2", *J Biol Chem* 271: 250-7 (1996)
25. Valentin, E. and Lambeau, G., "Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins", *Biochim Biophys Acta* 1488: 59-70. (2000)
26. Boesze-Battaglia, K., "Membrane properties that influence bovine retinal ROS membrane fusion", *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 35: 2139 (1994)
27. Hernandez, M., *et al.*, "Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1", *J Biol Chem* 273: 606-12 (1998)
28. Hernandez, M., *et al.*, "Secretory phospholipase A2 induces phospholipase Cgamma-1 activation and Ca²⁺ mobilization in the human astrocytoma cell line 1321N1 by a mechanism independent of its catalytic activity", *Biochem Biophys Res Commun* 260: 99-104 (1999)
29. Murakami, M., *et al.*, "The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 273: 14411-23. (1998)
30. Seilhamer, J. J., *et al.*, "Pancreatic phospholipase A2: isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung", *DNA* 5: 519-27. (1986)

31. Seilhamer, J. J., *et al.*, "Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid", *J Biol Chem* 264: 5335-8. (1989)
32. Chen, J., *et al.*, "Localization of group IIc low molecular weight phospholipase A2 mRNA to meiotic cells in the mouse", *J Cell Biochem* 64: 369-75. (1997)
33. Ishizaki, J., *et al.*, "Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A(2)s", *J Biol Chem* 274: 24973-9. (1999)
34. Suzuki, N., *et al.*, "Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s", *J Biol Chem* 275: 5785-93. (2000)
35. Valentin, E., *et al.*, "On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes", *J Biol Chem* 274: 31195-202. (1999)
36. Tischfield, J. A., *et al.*, "Low-molecular-weight, calcium-dependent phospholipase A2 genes are linked and map to homologous chromosome regions in mouse and human", *Genomics* 32: 328-33. (1996)
37. Cupillard, L., *et al.*, "Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2", *J Biol Chem* 272: 15745-52 (1997)
38. Gelb, M. H., *et al.*, "Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2", *J Biol Chem* 275: 39823-6. (2000)
39. Sharp, J. D., *et al.*, "Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 266: 14850-3. (1991)
40. Song, C., *et al.*, "Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta", *J Biol Chem* 274: 17063-7. (1999)

3.8 Tables and figures

TABLE 3.1. Primers used to amplify different types of PLA₂ expressed by RPE cells

Types of PLA ₂ (references)	Forward primers	Reverse primers	Length of PCR products (bp)
IB [30]	TGGTCATCTCAGTTCTTTTC	TCAACTCTGACAATACTTCT	482
IIA [31]	AGCCACCAAGGAGGAGCAGG	GTCATGAGTGACACAGCAGC	309
IIC [32]	CTGGACAACCTCCACCCTCA	TGGAGTTTGTCCCTGCCACA	406
IID [33]	ATCTGCCTCCACTGCTCTGTG	TCCATGCTGAGGAACAGGGTA	502
IIE [34]	CTTCTGCTGCCTTTTATGCTCC	CACAGCTTGTTGGGATAATGGG	455
IIF [35]	AGAAGTTCTTCACCGTGGCCAT	CTGGGGATTGGTGACTGCA	483
V [36]	GTGGATACCAATGTTCCGAC	CCTAGGAGCAGAGGATGTTG	549
X [37]	GGAATTCGCCTATATGAAATATGGT	GGAATTCAAGGTAGTCAGTCACACTTG	327
XII [38]	TTTGCGGCCGCATATGGAGCTGGCTGCTGCCAAGT	TTTAAGCTTCTAGAATCTGTCACTAGCTGTCGGCAT	717
cPLA ₂ α [39]	CATTTATAGATCCTTACCAG	CTATGCTTTGGGTTTACTTA	2987
cPLA ₂ β [40]	CACTTCTACCGGGACTGGGTCT	TCCTGGTTGTTGCAGACATTGT	2855
cPLA ₂ γ [12]	AGTTTCCATAATTCCTGGGCTC	GCCACGTTTCATCAACTCTCTAA	1564

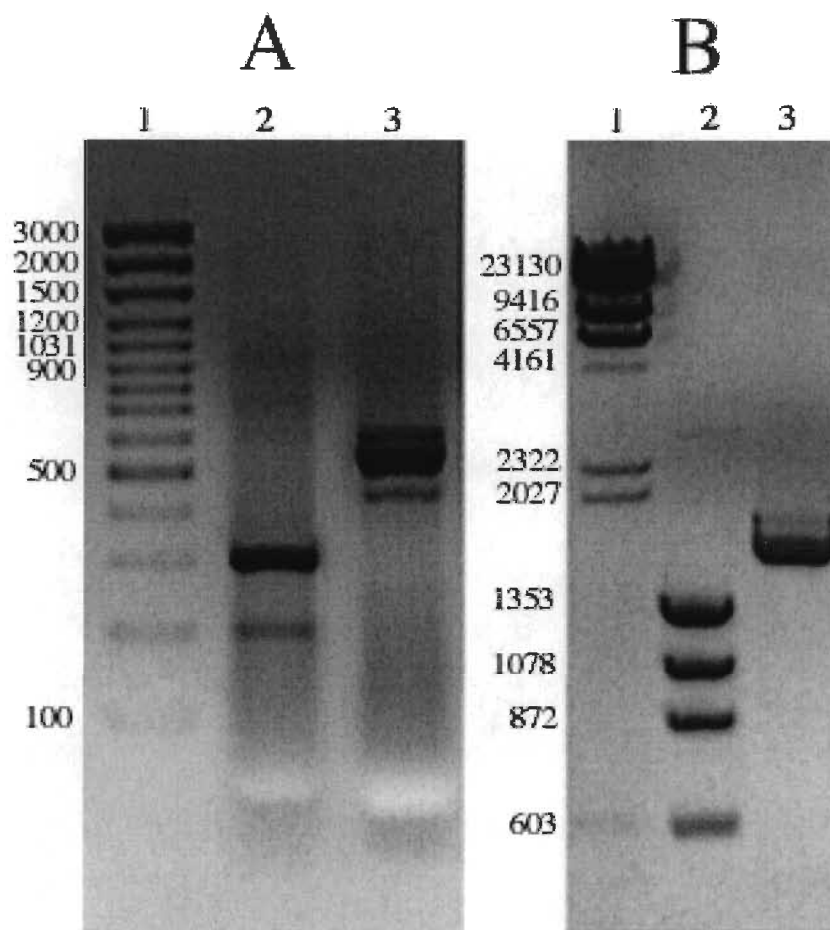


FIGURE 3.1. : Migration of PCR products of PLA₂s present in RPE. (A) PCR products of sPLA₂s. Lane 1 is the Gene Ruler 100 bp ladder Plus (Fermentas, Burlington, On). Lanes 2 and 3 are, respectively, PCR products of gIIA and gV sPLA₂s. (B) PCR products of cPLA₂. Lane 1 is the λ DNA- Hind III digest and lane 2 is the ϕ X174-Hae III digest. Lane 3 shows the cPLA₂ γ PCR product.

3.9 ANNEXES

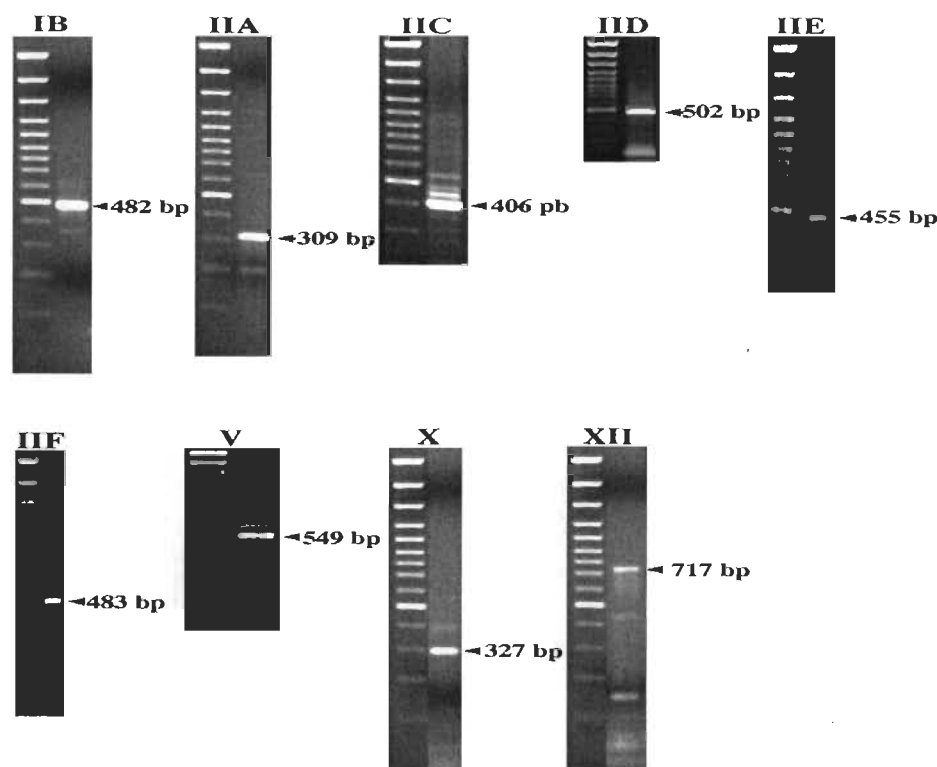


FIGURE 3.2. Contrôles positifs des différentes amorces de sPLA₂ présentées au tableau 3.1. Les PCR ont été effectués comme décrit à la section 3.3.1 en utilisant une température d'hybridation de 5 °C sous le T_m le plus bas de chacune des paires d'amorces utilisées dans la réaction PCR. Les ADNc humains utilisés lors des PCR proviennent de la compagnie Clontech sauf pour celui de l'EPR qui a été obtenu comme décrit à la section 3.3.1. L'ADNc du Le pancréas a été utilisé comme contrôle positif des sPLA₂ des groupes IB et IID, l'ADNc du cœur pour le groupe IIA, l'ADNc du placenta pour le groupe IIE, l'ADNc du cerveau pour le groupe IIF, l'ADNc de l'EPR pour le groupe V, l'ADNc de la cornée pour le groupe X et l'ADNc du muscle squeletique pour le groupe XII. Le marqueur de paires de base est le Gene Ruler100 bp ladder Plus (Fermentas, Burlington, On).

Note : Nous avons fait le design des amorces pour, autant que possible, amplifier toute la séquence codante de ces sPLA₂. Nous avons utilisé un programme de design d'amorce disponible sur le site <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer2> . Les paramètres que nous avons utilisés étaient un T_m d'environ 55-60 °C, des amorces d'environ 20 nucléotides, le moins de différences possibles de T_m entre les amorces et un pourcentage de GC de 40 à 60%.

clone_sPLA	1	ccgacgtcgc	atgctcccgg	CCGCCATGGC	GGCCGCGGGA	AttcgaattAG
sPLA2gIIA	1	-----	-----	CAACTCTGGA	GTCCTCTGAG	Ag-----AG
clone_sPLA	51	CCACCAAGGA	GGAGCAGGGG	AGCGACGGCC	GGGCAGAAAG	TTGAGACCAC
sPLA2gIIA	25	CCACCAAGGA	GGAGCAGGGG	AGCGACGGCC	GGGCAGAAAG	TTGAGACCAC
clone_sPLA	101	CCAGCAGAGG	AGCTAGGCCA	GTCCATCTGC	ATTGTGCACC	CAAGAACTCT
sPLA2gIIA	75	CCAGCAGAGG	AGCTAGGCCA	GTCCATCTGC	ATTGTGCACC	CAAGAACTCT
clone_sPLA	151	TACCATGAAG	ACCCTCCTAC	TGTTGGCAGT	GATCATGATC	TTTGGCCTAC
sPLA2gIIA	125	TACCATGAAG	ACCCTCCTAC	TGTTGGCAGT	GATCATGATC	TTTGGCCTAC
clone_sPLA	201	TGCAGGCCCA	TGGGAATTTG	GTGAATTTCC	ACAGAATGAT	CAAGTTGACG
sPLA2gIIA	175	TGCAGGCCCA	TGGGAATTTG	GTGAATTTCC	ACAGAATGAT	CAAGTTGACG
clone_sPLA	251	ACAGGAAAGG	AAGCCGCACT	CAGTTACGGC	TTCTAtGGCT	GCCACTGTGG
sPLA2gIIA	225	ACAGGAAAGG	AAGCCGCACT	CAGTTATGGC	TTCTAcGGCT	GCCACTGTGG
clone_sPLA	301	CGTGGGTGGC	AGAGGATCCC	CCAAGGATGC	AACGGATCGC	TGCTGTGTCA
sPLA2gIIA	275	CGTGGGTGGC	AGAGGATCCC	CCAAGGATGC	AACGGATCGC	TGCTGTGTCA
clone_sPLA	351	CTCATGAC--	-----	-----	-----	-----
sPLA2gIIA	325	CTCATGActg	ttgctacaaa	cgtctggaga	aacgtggatg	tggcaccaaa
clone_sPLA	359	-----	-----	-----	-----AATCA	CTAGTGAATT
sPLA2gIIA	375	tttctgagct	acaagtttag	caactcgggg	agcagAATCA	CCTGTGCAAA
clone_sPLA	374	CGCGGCCGCC	TGCAG--GTC	GACCATATGG	GAGAGCTCCC	AACGCgtttgg
sPLA2gIIA	425	ACAGGACTCC	TGCAGaaGTC	AACGTGTGTA	GTGTGATAAG	GCTGC-----
clone_sPLA	422	atgcatagct	tgagtattct	atagTGTCAC	CTAAATAGCT	TGgcgtaatc
sPLA2gIIA	470	-----	-----	----TGCCAC	CTGTTTTGCT	AG-----
clone_sPLA	472	atGGTCATAG	CTGTTTCCTG	TGTGAAATTG	TTATccgctc	ACAATTCCAC
sPLA2gIIA	488	--AAACAAGA	CGACCTACAA	TAAAAAGTAC	CAGT-----	ACTATTCCAA
clone_sPLA	522	ACAACAtacg	agcCGGAAGC	ATAAAGTGTA	AAGCCTGGGG	TGCCTAATGA
sPLA2gIIA	530	TAAAtCAcg-	---CAGAGGG	AGCACCCCTC	GTTGCTGAGT	CCCCTCTTCC
clone_sPLA	572	GTG--AGCTA	ACTCACATTA	ATTGCGTTGC	GCTCACTg--	-CCCGCTTTC
sPLA2gIIA	576	CTGgaAACCT	TCCACCCAGT	GCTGAATTTC	CCTCTCTcat	aCCCTCCCTC
clone_sPLA	617	CAGTCGGGAA	ACCTGT----	----CGTGCC	AGCTGCATTA	ATGAATCGGC
sPLA2gIIA	626	CCTACCCTAA	CCAAGTtcct	tggcCATGCA	GAAAGCATCC	CTCACCCATC
clone_sPLA	659	CAACGCGCGG	GGagaggcgg	tttgcgtatt	gGGCGCTCTT	CCGCTTCTCTC
sPLA2gIIA	676	CTAGAGGCCA	GGca-----	-----	-GGAGCCCTT	CTATACCCAC
clone_sPLA	709	GCTCACTGAC	TCg-----CT	GCGCTCGGTC	GTTGCGGCTGC	GGCGAGCGGT
sPLA2gIIA	709	CCAGAATGAG	ACatccagCA	GATTTCCAGC	CTTCTACTGC	TCTCTCCAC
clone_sPLA	754	ATCAGCTCa-	-----CT	CAAAGGCGGT	AATACGGtat	ncacagaatc
sPLA2gIIA	759	CTCAACTCcg	tgcttaacCA	AAGAAGCTGT	ACTCCGG---	-----
clone_sPLA	795	agGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAaggccag	caaaagggcc
sPLA2gIIA	796	--GGGTCTC	TTCTGAATAA	AGCAATTAGC	AAAtc-----	-----

FIGURE 3.3 Séquençage du clone du produit PCR de la sPLA₂ du groupe IIA. Les régions en jaune correspondent à la séquence du vecteur de clonage (pGEM-T easy cloning vector). Le codon d'initiation est en vert et celui de terminaison en rouge. L'amorce utilisée pour le séquençage est T7.

clone_sPLA	1	cgtcgcatgc tcccggccgc catggcggcc gcgggaattc gattg TGGAT
sPLA2gV	1	-----TGAT
clone_sPLA	51	ACCAATGTTC CGACTGGAGA CGGGGAGCCC GCGAGACCCG GGTCTCCAGG
sPLA2gV	6	ACCAATGTTC CGACTGGAGA CGGGGAGCCC GCGAGACCCG GGTCTCCAGG
clone_sPLA	101	GTCTGCCCAA GGAAGTTGCT CATGGGAGCA GACCTCTAGA GCAGGATTG
sPLA2gV	56	GTCTGCCCAA GGAAGTTGCT CATGGGAGCA GACCTCTAGA GCAGGATTG
clone_sPLA	151	AGGCCAGGCC AAAGAGAACC CCAGAG ATGA AAGGTCTCCT CCCACTGGCT
sPLA2gV	106	AGGCCAGGCC AAAGAGAACC CCAGAG ATGA AAGGCCTCCT CCCACTGGCT
clone_sPLA	201	TGGTTCCTGG CTTGTAGTGT GCCTGCTGTG CAAGGAGGCT TGCTGGACCT
sPLA2gV	156	TGGTTCCTGG CTTGTAGTGT GCCTGCTGTG CAAGGAGGCT TGCTGGACCT
clone_sPLA	251	AAAATCAATG ATCGAGAAGG TGACAGGGAA GAACGCCCTG ACAAATACG
sPLA2gV	206	AAAATCAATG ATCGAGAAGG TGACAGGGAA GAACGCCCTG ACAAATACG
clone_sPLA	301	GCTTCTACGG CTGTTACTGC GGCTGGGGCG GCCGAGGAAC CCCCAGGAT
sPLA2gV	256	GCTTCTACGG CTGTTACTGC GGCTGGGGCG GCCGAGGAAC CCCCAGGAT
clone_sPLA	351	GGCACCATT GGTGCTGTTG GGCATGATG CACTGCTATG GGCGGCTGGA
sPLA2gV	306	GGCACCATT GGTGCTGTTG GGCATGATG CACTGCTATG GGCGGCTGGA
clone_sPLA	401	GGAGAAGGGC TGCAACATTC GCACACAGTC CTACAAATAC AGATTTCGCT
sPLA2gV	356	GGAGAAGGGC TGCAACATTC GCACACAGTC CTACAAATAC AGATTTCGCT
clone_sPLA	451	GGGGCGTGGT CACCTGCGAG CCCGGGCCCT TCTGCCATGT GAACCTCTGT
sPLA2gV	406	GGGGCGTGGT CACCTGCGAG CCCGGGCCCT TCTGCCATGT GAACCTCTGT
clone_sPLA	501	GCCTGTGACC GGAAGCTCGT CTAAGCTCCTC AAGAGAAACC TACGGAGCTA
sPLA2gV	456	GCCTGTGACC GGAAGCTCGT CTAAGCTCCTC AAGAGAAACC TACGGAGCTA
clone_sPLA	551	CAACCCACAG TACCAATACT TTCCCAACAT CCTCTGCTCC TAGGAATCAC
sPLA2gV	506	CAACCCACAG TACCAATACT TTCCCAACAT CCTCTGCTCC TAGGCCTCCC
clone_sPLA	601	TAGTGaa--- -----
sPLA2gV	556	CAGCGagctc ctcccagacc aagacttttg ttctgttttt ctacaacaca
clone_sPLA	608	-----
sPLA2gV	606	gagtactgac tctgcctggt tctgagaga ggctcctaag tcacagacct
clone_sPLA	608	----- TTCG CGGCCGCC-- -----
sPLA2gV	656	cagtctttct cgaagcTTGG CGGACCCCa ggccacact gtaccctcca
clone_sPLA	620	-----
sPLA2gV	706	gcgagtccca ggagagtac tctggtcata ggacttggtta gggteccagg
clone_sPLA	620	----- T GCAGGTCGAC CATATGGg-- --AGAGCTCC
sPLA2gV	756	gtccctaggc ctccacttcT GAGGGCAGCC CCTCTGGtgc caAGAGCTCT
clone_sPLA	647	CAAC----- -GCGTTGGAT GCATAGCTTg agTATTCTAT AGTGTACCT
sPLA2gV	806	CCTCcaactc aGGGTTGGCT GTGTCTCTTt --TCTTCTCT GAAGACAGCG
clone_sPLA	690	AAATAGCTTg gcgtaatcat gGTCATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATTGNT
sPLA2gV	854	TCCTGGCTcc a----- -GTTGGAACA CTTTCCTGAG ATGCACTTAC

FIGURE 3.4 Séquençage du clone du produit PCR de la sPLA₂ du groupe V. Les régions en jaune correspondent à la séquence du vecteur de clonage (pGEM-T easy cloning vector). Le codon d'initiation est en vert et celui de terminaison en rouge. L'amorce utilisée pour le séquençage est T7.

CHAPITRE 4

EVIDENCE FOR THE EXPRESSION OF N- MYRISTOYLTRANSFERASES IN HUMAN RETINAL TISSUES

Soumis à :

FEBS Letters

EVIDENCE FOR THE EXPRESSION OF N-MYRISTOYLTRANSFERASES IN
HUMAN RETINAL TISSUES

Marc-André LAURIN, Dominique VERREAULT and Christian SALESSE

GREIB, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-
Rivières, QC, Canada, G9A 5H7.

4.1 Summary

Protein *N*-myristoyltransferase (NMT) has been recognized the enzyme responsible for the attachment of myristate onto the amino terminal glycine of specific polypeptides. Myristoylation has been demonstrated to be important for the protein physiological activity, both functionally and structurally. Ocular tissues, especially retinal pigmented epithelium (RPE) and retina, have long been speculated to contain some NMT activity, particularly because a number of photoreceptor proteins involved in phototransduction including recoverin and transducin alpha subunit are myristoylated. Human retinal *N*-myristoyltransferases (hrNMT) were identified in RPE and retinal tissues. The cDNAs encoding hrNMT1 and hrNMT2 were isolated using RT-PCR. The cDNAs of hrNMT1 and hrNMT2 have open reading frames of, respectively, 1488 and 1494 bp, which would encode proteins of, respectively, 496 and 498 amino acids with predicted molecular weights of, respectively, 56.8 and 57.0 kDa. From the analysis based on their nucleotidic and proteic sequences, it was concluded that the hrNMTs are comparable to NMTs from other mammalian tissues investigated so far. In fact, the two hrNMTs have 100% amino acid homology with available NMT from other human tissues and 76% when compared between them.

4.2 Introduction

N-terminal acylation of proteins is recognized as being functionally and structurally important in signal transduction, regulation, and cellular transformation (1-4). This type of lipid modification,

by which an acyl group can be covalently attached through an amide bond to the N-terminal amino acid of a nascent polypeptide, has been demonstrated to be a co-translational event (5). In all N-terminally acylated proteins of mammalian tissues studied so far, it has been observed that acylation takes place within the eight N-terminal residues and that a glycine residue is exclusively acylated with myristic acid (tetradecanoic acid) (6-9). Because of this feature, this modification has often been referred to as homogeneous N-terminal myristoylation.

Glycylpeptide: *N*-tetradecanoyltransferase (E.C. 2.1.3.97), also known as N-terminal myristoyltransferase (NMT), has been recognized as the endogenous enzyme responsible for transferring a myristoyl group from a myristoyl-CoA thioester to the N-terminal glycine residue of polypeptides (10,11). NMT proteins have been purified and characterized from various mammalian tissues (12-22) and their cDNAs have been isolated, cloned and expressed in different bacterial expression systems (16,20,23-30). So far, two distinct isoforms, NMT1 and NMT2, have been found only in mouse and human liver (23). Each of these NMT are highly homologous between species, displaying greater than 97 and 95% amino acid sequence homology. Human NMTs (hNMT1 and hNMT2) reveal 76% amino acid sequence homology, suggesting two distinct families of NMT and a higher level of genetic complexity underlying enzymology of N-terminal myristoylation.

Although N-myristoylated proteins have been shown to be expressed by human ocular tissues, no report has ever demonstrated the presence of NMT isoforms in these tissues. In the present paper, the two isoforms of NMTs are shown to be expressed in human retina as well as in the human retinal pigmented epithelium by RT-PCR. The cloning and sequencing of their cDNA has shown that they are essentially the same enzymes as those previously reported.

4.3 Materials and Methods

Synthesis of primers was performed by the Service de synthèse of the Centre de recherche du CHUL (Ste-Foy, QC, Canada) using a DNA synthesizer model ABI-394 from Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.). PCR and RT-PCR were performed using a PCR amplifier model Techgene from Techne (Princeton, NJ, U.S.A.). DNA sequencing was performed at SUCOF (Ste-Foy, QC, Canada). Human donor eyes (25-60 years old) were provided by the National Eye Bank, Inc. (Sainte-Foy, QC, Canada).

4.3.1 RNA extraction from retinal tissues

Human eyes were used within less than 24 hours post-mortem. The eyes were dissected and the RPE cells and retina were collected as described previously (31). Tissues were kept on ice prior to the extraction of RNA. Total RNA was extracted from these tissues according to the method developed by the group of Chomczynski (32,33) (Tri Reagent, Sigma Co., St-Louis, MO). The quality of total RNA was subsequently verified by electrophoresis on 1.0% agarose gel in TBE 1X running buffer (0.9 M Tris, 0.9 M boric acid and EDTA in distilled water) for possible degradation during the extraction procedure.

4.3.2 RT-PCR

The total RNA from human retina and RPE was reverse transcribed to cDNA using the SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) as

described in the manufacturer instructions. The cDNA of NMTs was amplified by PCR using two sets of NMT-specific primers (see table 3.1), which were prepared on the basis of the available NCBI sequences of mammalian NMT1 (accession number NM_021079) and NMT2 (accession number XM_005777). The first set of primers was synthesized on the basis of highly conserved sequences in the coding region of mammalian NMT1 and NMT2 cDNA (see table 3.1) whereas the second set of primers was designed to amplify the full cDNA of both hNMT1 and hNMT2 (see table 3.1). The reaction mixture contained 2 μ L of cDNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Burlington, ON, Canada), 10 % DMSO, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP mix and 0.5 mM of each NMT primers in a total volume of 50 μ L. The PCR reactions were run as following: 35 cycles of amplification at 55 °C for 40 seconds and elongation at 72°C for 2 minutes. The PCR products were then separated by electrophoresis on a 1.0%(w/v) agarose gel in TBE 1X running buffer. Nucleic acids molecular weight standards were purchased from Fermentas (Burlington, ON, Canada).

4.3.3 Cloning and sequencing of the PCR products

The bands containing the PCR products were extracted and purified with the Ultrafree-DA columns (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). The PCR products were cloned in pGEM-T Easy cloning vector (Promega, Madison, WI, U.S.A.) as described in the manufacturer instructions. The derivative recombinant plasmids were designated as pGEM-hrNMT1 and pGEM-hrNMT2. The mixture was then incubated at 4°C for 15 hours. The ligation mixture was transformed into competent *E. coli* DH5 α strain cells (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) using calcium phosphate coprecipitation method (Graham and Van der Eb, 1973). The transformed cells were

then plated and grown to a stationary phase at 37°C in LB medium containing ampicillin, IPTG and X-gal (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.). Plasmid purification was done with the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Laval, QC, Canada) followed by an *EcoRI* (NEB, Mississauga, ON, Canada) total digestion for selection of the positive clones. DNA sequencing of the positive clones was done using T7 and SP6 sequencing primers.

4.4 Results

Figure 4.1 shows the PCR products obtained with the first set of primers (P1/P2 and P3/P4). It can be seen that two PCR products of approximately 650 and 900 bp have been amplified. The size of these products is in good agreement with the one expected when using these primers (table 3.1). These data thus strongly suggest that both NMT isoforms are expressed in RPE and retina. Figure 4.2 shows the PCR products obtained in the retina with the second set of primers (P5/P6 and P7/P8) which allowed to amplify the complete sequence of hNMT1 and hNMT2. The size of these products is in good agreement with the ones expected with these primers (Table 3.1). These PCR products were then cloned and sequenced. The insert of NMT1 contains an open reading frame of 1488 bp which encodes a protein of 496 amino acids with a predicted molecular weight of 56 806 Da. The coding sequence of hrNMT1 has 100% nucleotide and amino acid homology with NMT1 from human brain and liver (Figure 4.3) (23). Moreover, the insert of NMT2 has an open reading frame of 1494 bp coding for a protein of 498 amino acids with a predicted molecular weight of 56 980 Da. The coding sequence of hrNMT2 has 100% nucleotide and amino acid identity with NMT2 from human liver and brain (Figure 4.4) (23).

4.5 Discussion

Our results clearly show that both NMT1 and NMT2 are expressed in human RPE and retina. The demonstration of the presence of NMTs in the retina is important since it has been proved that several photoreceptor proteins implicated in phototransduction including transducin alpha subunit (34,35), recoverin (36), guanylyl cyclase-activating proteins (37,38) and the C-subunit of protein kinase A (39) are heterogeneously N-terminal acylated with 14:0 as well as with 12:0, 14:1, and 14:2 acyl groups although myristate was found as the predominant acyl group (40). However, these NMTs could be expressed by cells other than photoreceptors although there has been no report until now on the presence of heterogeneously acylated proteins in the neural retina other than photoreceptors. Nevertheless, it would be very interesting to determine whether these NMTs are expressed by photoreceptors because it is still unclear whether the unique heteroacylation of several retinal proteins localized predominantly in the outer segments of the photoreceptor cells is determined by a photoreceptor cell-specific protein (41). The finding of the expression of these NMTs by photoreceptors would suggest that heterogeneous acylation of photoreceptor proteins is not due to these NMTs as they are not specifically expressed in photoreceptors since they have been found in several other tissues (6,42).

The finding of the expression of these NMTs by the RPE is very interesting and has never been demonstrated before. Indeed, there has been no report until now on the expression of NMTs by the RPE although the activity of arylamine N-acetyltransferase (NAT) has been measured (43). The demonstration of the presence of NMTs in the RPE is intriguing and opens the way to the understanding of the role they may play in these cells.

4.6 Acknowledgements

The authors are indebted to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la recherche for financial support. CS is a chercheur boursier national from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We are thankful to the National Eye Bank, Inc. (Ste-Foy Que. Canada) for providing us with human eyes.

4.7 References

1. Bhatnagar, A. and Gordon, J. I., "Understanding covalent modification of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle.", *Trends Cell Biol* 7: 14-20 (1998).
2. Casey, P. J., "Protein lipidation in cell signaling", *Science* 268: 221-5 (1995).
3. Chow, M., Der, C. J. and Buss, J. E., "Structure and biological effects of lipid modifications on proteins", *Curr Opin Cell Biol* 4: 629-36 (1992).
4. Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P. and Glaser, L., "The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation", *Annu Rev Biochem* 57: 69-99 (1988).
5. Wilcox, C., Hu, J. S. and Olson, E. N., "Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally", *Science* 238: 1275-8 (1987).
6. Boutin, J. A., "Myristoylation", *Cell Signal* 9: 15-35 (1997).
7. Johnson, D. R., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J. and Gordon, J. I., "Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation", *Annu Rev Biochem* 63: 869-914 (1994).
8. Gordon, J. I., Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P. and Gokel, G. W., "Protein N-myristoylation", *J Biol Chem* 266: 8647-50 (1991).

9. Gordon, J. I., "Protein N-myristoylation: simple questions, unexpected answers", *Clin Res* 38: 517-28 (1990).
10. Towler, D. A., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Adams, S. P. and Glaser, L., "Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase", *J Biol Chem* 262: 1030-6 (1987).
11. Towler, D. A., Adams, S. P., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L. and Gordon, J. I., "Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N- myristoyltransferase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2708-12 (1987).
12. Paige, L. A., Chafin, D. R., Cassady, J. M. and Geahlen, R. L., "Detection of myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activity by ion-exchange chromatography", *Anal Biochem* 181: 254-8 (1989).
13. McIlhinney, R. A. and McGlone, K., "A simplified assay for the enzyme responsible for the attachment of myristic acid to the N-terminal glycine residue of proteins, myristoyl-CoA: glycylopeptide N-myristoyltransferase", *Biochem J* 263: 387-91 (1989).
14. Towler, D. A., Adams, S. P., Eubanks, S. R., Towery, D. S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L. and Gordon, J. I., "Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities", *J Biol Chem* 263: 1784-90 (1988).
15. Glover, C. J. and Felsted, R. L., "Identification and characterization of multiple forms of bovine brain N- myristoyltransferase", *J Biol Chem* 270: 23226-33 (1995).
16. McIlhinney, R. A., "Characterization and cellular localization of human myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase", *Biochem Soc Trans* 23: 549-53 (1995).
17. McIlhinney, R. A., McGlone, K. and Willis, A. C., "Purification and partial sequencing of myristoyl-CoA:protein N- myristoyltransferase from bovine brain", *Biochem J* 290: 405-10 (1993).

18. King, M. J. and Sharma, R. K., "Demonstration of multiple forms of bovine brain myristoyl CoA:protein N- myristoyl transferase", *Mol Cell Biochem* 113: 77-81 (1992).
19. McIlhinney, R. A. and McGlone, K., "Characterization of the myristoyl CoA:glycylpeptide N-myristoyl transferase from rat and bovine brain", *Biochem Soc Trans* 20: 341S (1992).
20. Raju, R. V., Kakkar, R., Datla, R. S., Radhi, J. and Sharma, R. K., "Myristoyl-coA:protein N-myristoyltransferase from bovine cardiac muscle: molecular cloning, kinetic analysis, and in vitro proteolytic cleavage by m-calpain", *Exp Cell Res* 241: 23-35 (1998).
21. Raju, R. V., Kalra, J. and Sharma, R. K., "Purification and properties of bovine spleen N-myristoyl-CoA protein:N- myristoyltransferase", *J Biol Chem* 269: 12080-3 (1994).
22. Raju, R. V., Anderson, J. W., Datla, R. S. and Sharma, R. K., "Molecular cloning and biochemical characterization of bovine spleen myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase", *Arch Biochem Biophys* 348: 134-42 (1997).
23. Giang, D. K. and Cravatt, B. F., "A second mammalian N-myristoyltransferase", *J Biol Chem* 273: 6595-8 (1998).
24. Raju, R. V., Datla, R. S., Kakkar, R. and Sharma, R. K., "Recombinant bovine spleen myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase", *Mol Cell Biochem* 189: 91-7 (1998).
25. Young, K., Egerton, M., Camble, R., White, A. and McIlhinney, R. A., "Immunochemical characterization of human N-myristoyltransferase: evidence for more than one form of the enzyme", *Biochem Soc Trans* 25: S631 (1997).
26. Raju, R. V., Datla, R. S. and Sharma, R. K., "Overexpression of human N-myristoyltransferase utilizing a T7 polymerase gene expression system", *Protein Expr Purif* 7: 431-7 (1996).
27. Raju, R. V. and Sharma, R. K., "Coenzyme A dependent myristoylation and demyristoylation in the regulation of bovine spleen N-myristoyltransferase", *Mol Cell Biochem* 158: 107-13 (1996).

28. McIlhinney, R. A., Patel, P. B. and McGlone, K., "Characterization of a polyhistidine-tagged form of human myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase produced in *Escherichia coli*", *Eur J Biochem* 222: 137-46 (1994).
29. Duronio, R. J., Reed, S. I. and Gordon, J. I., "Mutations of human myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase cause temperature-sensitive myristic acid auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4129-33 (1992).
30. Glover, C. J., Hartman, K. D. and Felsted, R. L., "Human N-myristoyltransferase amino-terminal domain involved in targeting the enzyme to the ribosomal subcellular fraction", *J Biol Chem* 272: 28680-9 (1997).
31. Van Themsche, C., Jacob, M. and Salesse, C., "Human retinal pigment epithelium secretes a phospholipase A2 and contains two novel intracellular phospholipases A2", *Biochem Cell Biol* 79: 1-10 (2001).
32. Chomczynski, P. and Sacchi, N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction", *Anal Biochem* 162: 156-9 (1987).
33. Chomczynski, P., "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples", *Biotechniques* 15: 532-4, 536-7 (1993).
34. Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T. and Shimonishi, Y., "Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha- subunit", *Nature* 359: 749-52 (1992).
35. Neubert, T. A., Johnson, R. S., Hurley, J. B. and Walsh, K. A., "The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated", *J Biol Chem* 267: 18274-7 (1992).
36. Dizhoor, A. M., Ericsson, L. H., Johnson, R. S., Kumar, S., Olshevskaya, E., Zozulya, S., Neubert, T. A., Stryer, L., Hurley, J. B. and Walsh, K. A., "The NH2 terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids", *J Biol Chem* 267: 16033-6 (1992).

37. Haeseleer, F., Sokal, I., Li, N., Pettenati, M., Rao, N., Bronson, D., Wechter, R., Baehr, W. and Palczewski, K., "Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase- activating protein subfamily", *J Biol Chem* 274: 6526-35 (1999).
38. Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, W. A., Helekar, B. S., Ruiz, C. C., Ohguro, H., Huang, J., Zhao, X., Crabb, J. W., Johnson, R. S. and et al., "Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein", *Neuron* 13: 395-404 (1994).
39. Carr, S. A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D. C. and Titani, K., "n-Tetradecanoyl is the NH₂-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle", *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6128-31 (1982).
40. DeMar, J. C., Jr., Rundle, D. R., Wensel, T. G. and Anderson, R. E., "Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins", *Prog Lipid Res* 38: 49-90 (1999).
41. Shouno, O., Sanada, K., Asano, T. and Fukada, Y., "Characterization of N-acylation of Go alpha purified from bovine retinas", *Neuroreport* 10: 2999-3002 (1999).
42. Rajala, R. V., Datla, R. S., Moyana, T. N., Kakkar, R., Carlsen, S. A. and Sharma, R. K., "N-myristoyltransferase", *Mol Cell Biochem* 204: 135-55 (2000).
43. Gaudet, S. J., Tsilou, E. and Chader, G. J., "Identification and characterization of arylamine N-acetyltransferase activity from the bovine retinal pigment epithelium", *Curr Eye Res* 12: 271-8 (1993).

4.8 Tables and figures

TABLE 3.1 : Primers used for the screening of the expression of NMTs by RPE and retina

Primer	<u>Region amplified</u>	<u>Sens 5'-3'</u>	<u>Antisens 5'-3'</u>	Lenght of PCR product (bp)
P1/P2	conserved sequence of NMT1	GAGATCAACTTCCTGTGTGT	AACTTGAGCTTCTCCAGGAA	654
P3/P4	conserved sequence of NMT2	GGTTTTATGTGGGACACTTT	CCAAGAAKGTCTTATTTTCC	925
P5/P6	complete hNMT1	GCAACTCAAGATGGCGGACGA	ATCGCACTGGTGACTGGTTA	1518
P7/P8	complete hNMT2	TCCGGAGGCACCAAGTCAGA	GGCAGTTCCAGAAATCGTAC	1385

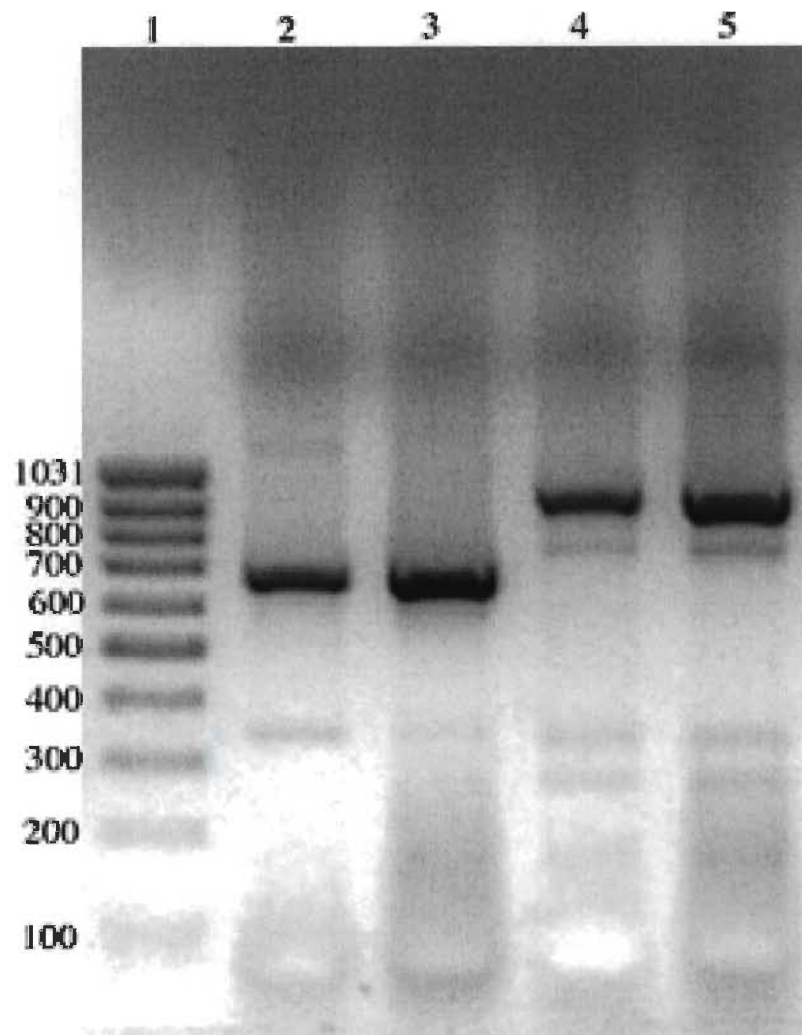


FIGURE 4.1. : Migration of PCR products of NMTs present in RPE and retina using the first set of primers. Lane 1 is Gene Ruler 100 bp ladder. Lanes 2 and 3 are, respectively, NMT1 in the retina and the RPE. Lanes 4 and 5 are, respectively, NMT2 in the retina and the RPE.

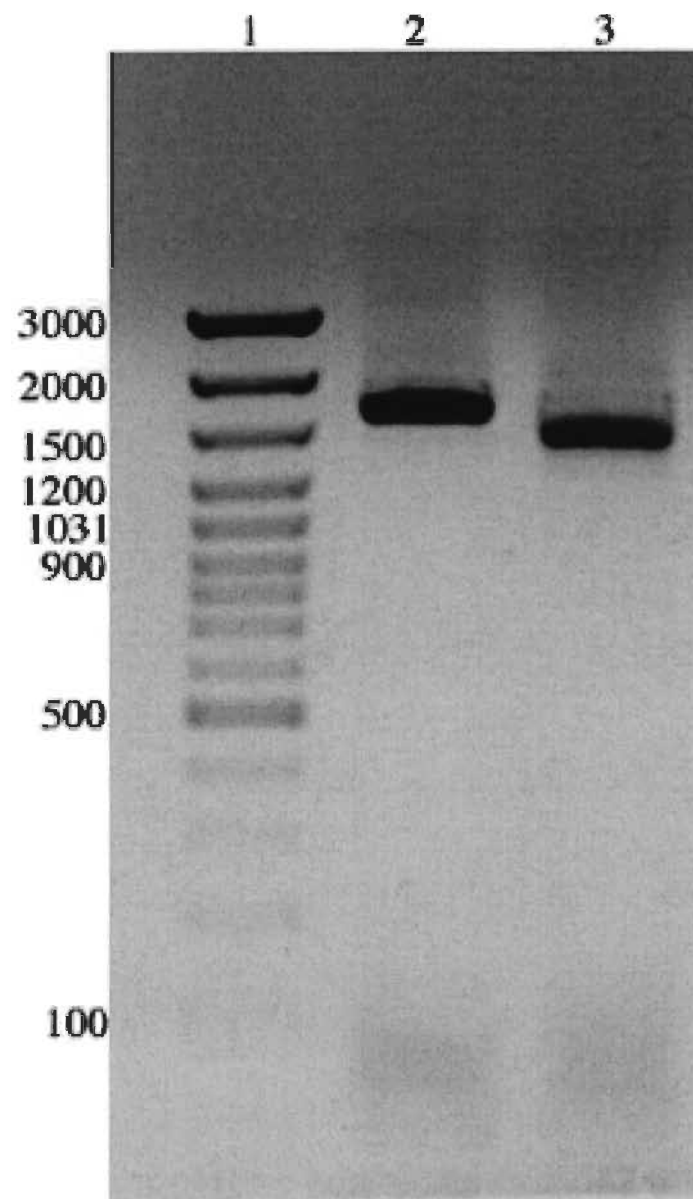


FIGURE. 4.2. : Migration of PCR products of NMTs present in the retina using the second set of primers. Lane 1 is Gene Ruler 100 bp ladder Plus. Lanes 2 and 3 are, respectively, PCR products of the complete coding sequences of NMT1 and NMT2.

4.8 Annexes

1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	1	tgctccaacg	cgttgggagc	tctcccatat	ggtcgacctg	caggcggccg
NMT1	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	51	cgaattcact	agtgattGCA	ACTCAAGATG	GCGGACGAGA	GTGAGACAGC
NMT1	1	-----	-----GCA	ACTCAAGATG	GCGGACGAGA	GTGAGACAGC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	101	AGTGAAGCCG	CCGGCACCTC	CGCTGCCGCA	GATGATGGAA	GGAACGGGA
NMT1	34	AGTGAAGCCG	CCGGCACCTC	CGCTGCCGCA	GATGATGGAA	GGAACGGGA
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	151	ACGGCCATGA	GCACTGCAGC	GATTGCGAGA	ATGAGGAGGA	CAACAGCTAC
NMT1	84	ACGGCCATGA	GCACTGCAGC	GATTGCGAGA	ATGAGGAGGA	CAACAGCTAC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	201	AACCGGGGTG	GTTTGAGTCC	AGCCAATGAC	ATTGGAGCCA	AAAAGAAGAA
NMT1	134	AACCGGGGTG	GTTTGAGTCC	AGCCAATGAC	ACTGGAGCCA	AAAAGAAGAA
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	251	AAAGAAACAA	AAAAAGAAGA	AAGAAAAAGG	CAGTGAGACA	GATTCAGCCC
NMT1	184	AAAGAAACAA	AAAAAGAAGA	AAGAAAAAGG	CAGTGAGACA	GATTCAGCCC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	301	AGGATCAGCC	TGTGAAGATG	AACTCTTTCG	CAGCAGAGAG	GATCCAGGAA
NMT1	234	AGGATCAGCC	TGTGAAGATG	AACTCTTTCG	CAGCAGAGAG	GATCCAGGAA
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	351	ATACAGAAGG	CCATTGAGCT	GTTCTCAGTG	GGTCAGGGAC	CTGCCAAAAC
NMT1	284	ATACAGAAGG	CCATTGAGCT	GTTCTCAGTG	GGTCAGGGAC	CTGCCAAAAC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	401	CATGGAGGAG	GCTAGCAAGC	GAAGCTACCA	GTTCTGGGAT	ACGCAGCCCC
NMT1	334	CATGGAGGAG	GCTAGCAAGC	GAAGCTACCA	GTTCTGGGAT	ACGCAGCCCC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	451	TCCCCAAGCT	GGGCGAAGTG	GTGAACACCC	ATGGCCCCGT	GGAGCCTGAC
NMT1	384	TCCCCAAGCT	GGGCGAAGTG	GTGAACACCC	ATGGCCCCGT	GGAGCCTGAC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	501	AAGGACAATA	TCCGCCAGGA	GCCCTACACC	CTGCCCCAGG	GCTTCACCTG
NMT1	434	AAGGACAATA	TCCGCCAGGA	GCCCTACACC	CTGCCCCAGG	GCTTCACCTG
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----

1.1_SP6F	551	GGATGCTTTG	GACCTGGGCG	ATCGTGGTGT	GCTAAAAGAA	CTGTACACCC
NMT1	484	GGATGCTTTG	GACTTGGGCG	ATCGTGGTGT	GCTAAAAGAA	CTGTACACCC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	601	TCCTGAATGA	GAACATATGTG	GAAGATGATG	ACAACATGTT	CCGATTTGAT
NMT1	534	TCCTGAATGA	GAACATATGTG	GAAGATGATG	ACAACATGTT	CCGATTTGAT
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	1	TATTCCCCGG	AGTTTCTTTT	GTGGGCTCTC	CGGCCACCCG	GCTGGCTCCC
1.1_SP6F	651	TATTCCCCGG	AGTTTCTTTT	GTGGGCTCTC	CGGCCACCCG	GCTGGCTCCC
NMT1	584	TATTCCCCGG	AGTTTCTTTT	GTGGGCTCTC	CGGCCACCCG	GCTGGCTCCC
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	51	CCAGTGGCAC	TGTGGGGTTC	GAGTGGTCTC	AAGTCGGA	TTGGTTGGGT
1.1_SP6F	701	CCAGTGGCnn	cnttnGGTTC	GAGTGGTCTC	AAGTCGGA	TTGGnTGGGT
NMT1	634	CCAGTGGCAC	TGTGGGGTTC	GAGTGGTCTC	AAGTCGGA	TTGGTTGGGT
1.1_T7R	1	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_NMT1SI	101	TCATTAGCGC	CATCCCAGCA	AACATCCATA	TCTATGACAC	AGAGAAGAAG
1.1_SP6F	751	TCATTAGCGC	CATCCCAGCA	AACATCCATA	TCTATGACAC	AGAGAAGAAG
NMT1	684	TCATTAGCGC	CATCCCAGCA	AACATCCATA	TCTATGACAC	AGAGAAGAAG
1.1_T7R	1	ATGGTAAGAG	ATCAACTTNC	CTgGTGTGTC	CACAAGAAGC	TGCGTTCCAA
1.1_NMT1SI	151	ATGG-TAGAG	ATCAAC-TTC	CT-GTGTGTC	CACAAGAAGC	TGCGTTCCAA
1.1_SP6F	801	ATGGGTAGAG	ATCAACNTTC	CT-GTGTGTC	CACAAGAA--	-----
NMT1	734	ATGG-TAGAG	ATCAAC-TTC	CT-GTGTGTC	CACAAGAAGC	TGCGTTCCAA
1.1_T7R	51	GAGGGTTGCT	CCAGTTCTGA	TCCGAGAGAT	CAC-AGGCGG	GTTACCTGG
1.1_NMT1SI	198	GAGGGTTGCT	CCAGTTCTGA	TCCGAGAGAT	CACCAGGCGG	GTTACCTGG
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	781	GAGGGTTGCT	CCAGTTCTGA	TCCGAGAGAT	CACCAGGCGG	GTTACCTGG
1.1_T7R	100	AGGGCATCTT	CCAAGCAGTT	TACActgccc	GGGTGGTAC	TACCAAAGCC
1.1_NMT1SI	248	AGGGCATCTT	CCAAGCAGTT	TACACTGCC-	GGGTGGTAC	TACCAAAGCC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	831	AGGGCATCTT	CCAAGCAGTT	TACACTGCC-	GGGTGGTAC	TACCAAAGCC
1.1_T7R	150	CGTTGGCACC	TGCAGGTATT	GGCATCGGTC	CCTAAACCCA	CGGAAGCTGA
1.1_NMT1SI	297	CGTTGGCACC	TGCAGGTATT	GGCATCGGTC	CCTAAACCCA	CGGAAGCTGA
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	880	CGTTGGCACC	TGCAGGTATT	GGCATCGGTC	CCTAAACCCA	CGGAAGCTGA
1.1_T7R	200	TTGAAGTGAA	GTTCTCCAC	CTGAGCAGAA	ATATGACCAT	GCAGCGCACC
1.1_NMT1SI	347	TTGAAGTGAA	GTTCTCCAC	CTGAGCAGAA	ATATGACCAT	GCAGCGCACC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	930	TTGAAGTGAA	GTTCTCCAC	CTGAGCAGAA	ATATGACCAT	GCAGCGCACC
1.1_T7R	250	ATGAAGCTCT	ACCGACTGCC	AGAGACTCCC	AAGACAGCTG	GGCTGCGACC
1.1_NMT1SI	397	ATGAAGCTCT	ACCGACTGCC	AGAGACTCCC	AAGACAGCTG	GGCTGCGACC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	980	ATGAAGCTCT	ACCGACTGCC	AGAGACTCCC	AAGACAGCTG	GGCTGCGACC
1.1_T7R	300	AATGGAAACA	AAGGACATTC	CAGTAGTGCA	CCAGCTCCTC	ACCAGGTACT
1.1_NMT1SI	447	AATGGAAACA	AAGGACATTC	CAGTAGTGCA	CCAGCTCCTC	ACCAGGTACT
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1030	AATGGAAACA	AAGGACATTC	CAGTAGTGCA	CCAGCTCCTC	ACCAGGTACT
1.1_T7R	350	TGAAGCAATT	TCACCTTACG	CCCGTCATGA	GCCAGGAGGA	GGTGGAGCAC
1.1_NMT1SI	497	TGAAGCAATT	TCACCTTACG	CCCGTCATGA	GCCAGGAGGA	GGTGGAGCAC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1080	TGAAGCAATT	TCACCTTACG	CCCGTCATGA	GCCAGGAGGA	GGTGGAGCAC

1.1_T7R	400	TGGTTCTACC	CCCAGGAGAA	TATCATCGAC	ACTTTCGTGG	TGGAGAACGC
1.1_NMT1SI	547	TGGTTCTACC	CCCAGGAGAA	TATCATCGAC	ACTTTCGTGG	TGGAGAACGC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1130	TGGTTCTACC	CCCAGGAGAA	TATCATCGAC	ACTTTCGTGG	TGGAGAACGC
1.1_T7R	450	AAACGGAGAG	GTGACAGATT	TCCTGAGCTT	TTATACGCTG	CCCTCCACCA
1.1_NMT1SI	597	AAACGGAGAG	GTGACAGATT	TCCTGAGCTT	TTATACGCTG	CCCTCCACCA
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1180	AAACGGAGAG	GTGACAGATT	TCCTGAGCTT	TTATACGCTG	CCCTCCACCA
1.1_T7R	500	TCATGAACCA	TCCAACCCAC	AAGAGTCTCA	AAGCTGCTTA	TTCTTTCTAC
1.1_NMT1SI	647	TCATGAACCA	TCCAACCCAC	AAGAGTCTCA	AAGCTGCTTA	TTCTTTCTAC
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1230	TCATGAACCA	TCCAACCCAC	AAGAGTCTCA	AAGCTGCTTA	TTCTTTCTAC
1.1_T7R	550	AACGTTTACA	CCCAGACCCC	TCTTCTAGAC	CTCATGAGCG	ACGCCCTTGT
1.1_NMT1SI	697	AACGTTTACA	CCCAGACCCC	TCTTCTAGAC	CTCATGAGCG	ACGCCCTTGT
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1280	AACGTTTACA	CCCAGACCCC	TCTTCTAGAC	CTCATGAGCG	ACGCCCTTGT
1.1_T7R	600	CCTCGCCAAA	ATGAAAGGGT	TTGATGTGTT	CAATGCACTG	GATCTCATGG
1.1_NMT1SI	747	CCTCGCCAAA	ATGAAAGGGT	TTGATGTGTT	CAATGCACTG	GATCTCATGG
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1330	CCTCGCCAAA	ATGAAAGGGT	TTGATGTGTT	CAATGCACTG	GATCTCATGG
1.1_T7R	650	AGAACAAAAC	CTTCCTGGAG	AAGCTCAAGT	TTGGCATAGG	GGACGGCAAC
1.1_NMT1SI	797	AGAACAAAAC	CTT-CTGGAG	AAGCT-AAGT	TTGGCcttt-	-----
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1380	AGAACAAAAC	CTTCCTGGAG	AAGCTCAAGT	TTGGCATAGG	GGACGGCAAC
1.1_T7R	700	CTGCAGTATT	ACCTTTACAA	TTGGAAATGC	CCCAGCATGG	GGGCAGAGAA
1.1_NMT1SI	834	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1430	CTGCAGTATT	ACCTTTACAA	TTGGAAATGC	CCCAGCATGG	GGGCAGAGAA
1.1_T7R	750	GGTTGGACTG	GTGCTACAAT	AACCAGTCAC	CAGTGCGATa	atcgaattcc
1.1_NMT1SI	834	-----	-----	-----	-----	-----
1.1_SP6F	838	-----	-----	-----	-----	-----
NMT1	1480	GGTTGGACTG	GTGCTACAAT	AACCAGTCAC	CAGTGCGATt	ctggataaag

FIGURE 4.3. Séquencage du clone du produit PCR de la NMT1 en entier. Les régions en jaune correspondent à la séquence du vecteur de clonage (pGEM-T easy cloning vector). Les codons d'initiations sont en vert et de terminaisons en rouge. Les amorces utilisées pour le séquençage sont T7, SP6 et une amorce interne qui correspond au 20 premiers nucléotides de la séquence 1.1_NMT1SI.

2.3_T7F	1	cccgacgtcg	catgctcccg	g-----c	cgccatggcg	gccgcgggaa
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	1	n-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	1	ctccggcccg	gccccgagca	ccgcctcccc	agccagcgcc	gccgcg----
2.3_T7F	43	ttcgattATG	GCGGAGGACA	GCGAGTCTGC	GGCCAGCCAG	CAGAGCCTGG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	47	-----ATG	GCGGAGGACA	GCGAGTCTGC	GGCCAGCCAG	CAGAGCCTGG
2.3_T7F	93	AACTGGACGA	CCAGGACACG	TGCGGGATAG	ACGGGGACAA	TGAGGAGGAG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	90	AACTGGACGA	CCAGGACACG	TGCGGGATAG	ACGGGGACAA	TGAGGAGGAG
2.3_T7F	143	ACGGAGCACG	CCAAAGGAAG	TCCTGGAGGG	TATTTGGGAG	CCAAAAAGAA
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	140	ACGGAGCACG	CCAAAGGAAG	TCCTGGAGGG	TATTTGGGAG	CCAAAAAGAA
2.3_T7F	193	AAAGAAGAAA	CAGAAGAGAA	AAAAGGAGAA	ACCAAATTCC	GGAGGCACCA
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	190	AAAGAAGAAA	CAGAAGAGAA	AAAAGGAGAA	ACCAAATTCC	GGAGGCACCA
2.3_T7F	243	AGTCAGACTC	GGCATCTGAT	TCCCAGGAGA	TTAAAATTCA	GCAGCCTTCG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	240	AGTCAGACTC	GGCATCTGAT	TCCCAGGAGA	TTAAAATTCA	GCAGCCTTCG
2.3_T7F	293	AAAAATCCCA	GTGTTCCAAT	GCAGAAGTTG	CAGGATATCC	AGAGAGCAAT
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	290	AAAAATCCCA	GTGTTCCAAT	GCAGAAGTTG	CAGGATATCC	AGAGAGCAAT
2.3_T7F	343	GGAGCTGCTA	TCCGCATGCC	AGGGCCCAGC	CAGGAACATT	GATGGGGCTG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	340	GGAGCTGCTA	TCCGCATGCC	AGGGCCCAGC	CAGGAACATT	GATGAGGCTG
2.3_T7F	393	CAAAGCACAG	ATACCAGTTT	TGGGACACAC	AACCGGTACC	AAAAC TAGAT
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	390	CAAAGCACAG	ATACCAGTTT	TGGGACACAC	AACCGGTACC	AAAAC TAGAT
2.3_T7F	443	GAAGTCATAA	CATCTCATGG	TGCAATTGAA	CCAGATAAAG	ACAACGTACG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	440	GAAGTCATAA	CATCTCATGG	TGCAATTGAA	CCAGATAAAG	ACAACGTACG
2.3_T7F	493	CCAAGAACCG	TATTCTTTGC	CACAGGGTTT	TATGTGGGAC	ACTTTAGACT
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	490	CCAAGAACCG	TATTCTTTGC	CACAGGGTTT	TATGTGGGAC	ACTTTAGACT
2.3_T7F	543	TGAGTGATGC	CGAAGTGCTC	AAGGAGTTAT	ACACGTTGTT	AAATGAGAAT
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	540	TGAGTGATGC	CGAAGTGCTC	AAGGAGTTAT	ACACGTTGTT	AAATGAGAAT

2.3_T7F	593	TACGTAGAAG	ATGATGACAA	TATGTTCCGA	TTTGACTATT	CACCCGAGTT
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	590	TACGTAGAAG	ATGATGACAA	TATGTTCCGA	TTTGACTATT	CACCCGAGTT
2.3_T7F	643	CCTGTTGTGG	GCTCTGCGTC	CACCAGGCTG	GCTCCTGCAG	TGGCACTGTG
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	640	CCTGTTGTGG	GCTCTGCGTC	CACCAGGCTG	GCTCCTGCAG	TGGCACTGTG
2.3_T7F	693	GAGTCAGAGT	GTCTTCAAAT	AAAAAACTGG	TCGGGTTTCAT	AAGTGCCATC
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	690	GGGTCAGAGT	GTCTTCAAAT	AAAAAACTGG	TCGGGTTTCAT	AAGTGCCATC
2.3_T7F	743	CCAGCAAACA	TTCGGATTTA	TGACAGTGTG	AAGAAGATGG	TAGAAATCAA
2.3_NMT2SI	1	-----	-----	-----	---AAGATGG	TAGAAATCAA
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	740	CCAGCAAACA	TTCGGATTTA	TGACAGTGTG	AAGAAGATGG	TAGAAATCAA
2.3_T7F	793	CTTTCTTTGT	GTTTCATAAGA	AGTTGGGATC	GAAACGGGTA	GCCCCAGGGC
2.3_NMT2SI	18	CTTTCTTTGT	GTTTCATAAGA	AGTTGGGATC	GAAACGGGTA	GCCCCAGGGC
2.3_SP6R	2	-----	-----	-----	-----	-----
NMT2	790	CTTTCTTTGT	GTTTCATAAGA	AGTTGAGATC	GAAACGGGTA	GCCCCAGTGC
2.3_T7F	843	TAATCCcGAG	AGATCACTAG	AAGAGTGAAC	CTGGAAGGGA	TCTTCCAGG-
2.3_NMT2SI	68	TAATCC-GAG	AGATCACTAG	AAGAGTGAAC	CTGGAAGGGA	TCTTCCAGG-
2.3_SP6R	2	-----	-GATCACTAG	AAGAGTGAAC	CTGGAAGGGA	TCTTCCAGGg
NMT2	840	TAATCC-GAG	AGATCACTAG	AAGAGTGAAC	CTGGAAGGGA	TCTTCCAGG-
2.3_T7F	892	CTGTGTACAC	CGCGGGAGTG	GTTCTTCCTA	AGCCCATAGC	CACATGCAGA
2.3_NMT2SI	116	CTGTGTACAC	CGCGGGAGTG	GTTCTTCCTA	AGCCCATAGC	CACATGCAGA
2.3_SP6R	41	CTGTGTACAC	CGCGGGAGTG	GTTCTTCCTA	AGCCCATAGC	CACATGCAGA
NMT2	888	CTGTGTACAC	CGCGGGAGTG	GTTCTTCCTA	AGCCCATAGC	CACATGCAGA
2.3_T7F	942	TACTGGCATC	GATCACTAAA	CCCCAGAAAA	TTGGTAGAAG	TGAAATTTTC
2.3_NMT2SI	166	TACTGGCATC	GATCACTAAA	CCCCAGAAAA	TTGGTAGAAG	TGAAATTTTC
2.3_SP6R	91	TACTGGCATC	GATCACTAAA	CCCCAGAAAA	TTGGTAGAAG	TGAAATTTTC
NMT2	938	TACTGGCATC	GATCACTAAA	CCCCAGAAAA	TTGGTAGAAG	TGAAATTTTC
2.3_T7F	992	TCACTTGAGT	AGAAATATGA	CTT-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	216	TCACTTGAGT	AGAAATATGA	CTTTACAGAG	AACAATGAAG	CTATACAGAC
2.3_SP6R	141	TCACTTGAGT	AGAAATATGA	CTTTACAGAG	AACAATGAAG	CTATACAGAC
NMT2	988	TCACTTGAGT	AGAAATATGA	CTTTACAGAG	AACAATGAAG	CTATACAGAC
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	266	TTCCAGATGT	TACAAAGACT	TCAGGTTTGA	GACCAATGGA	ACCAAAAGAT
2.3_SP6R	191	TTCCAGATGT	TACAAAGACT	TCAGGTTTGA	GACCAATGGA	ACCAAAAGAT
NMT2	1038	TTCCAGATGT	TACAAAGACT	TCAGGTTTGA	GACCAATGGA	ACCAAAAGAT
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	316	ATCAAATCAG	TTCGAGAATT	AATCAACACT	TACCTGAAGC	AGTTTCATCT
2.3_SP6R	241	ATCAAATCAG	TTCGAGAATT	AATCAACACT	TACCTGAAGC	AGTTTCATCT
NMT2	1088	ATCAAATCAG	TTCGAGAATT	AATCAACACT	TACCTGAAGC	AGTTTCATCT
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	366	GGCTCCAGTG	ATGGATGAAG	AGGAAGTAGC	CCACTGGTTC	CTCCCCCGGG
2.3_SP6R	291	GGCTCCAGTG	ATGGATGAAG	AGGAAGTAGC	CCACTGGTTC	CTCCCCCGGG
NMT2	1138	GGCTCCAGTG	ATGGATGAAG	AGGAAGTAGC	CCACTGGTTC	CTCCCCCGGG
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	416	AGCACATTAT	TGACACGTTT	GTAGTGGAGA	GCCCCAACGG	TAAACTGACT
2.3_SP6R	341	AGCACATTAT	TGACACGTTT	GTAGTGGAGA	GCCCCAACGG	TAAACTGACT

NMT2	1188	AGCACATTAT	TGACACGTTT	GTAGTGGAGA	GCCCCAACGG	TAAACTGACT
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	466	GATTTCTGA	GCTTCTATAC	GCTCCCCTCC	ACGGTGATGC	ACCACCCTGC
2.3_SP6R	391	GATTTCTGA	GCTTCTATAC	GCTCCCCTCC	ACGGTGATGC	ACCACCCTGC
NMT2	1238	GATTTCTGA	GCTTCTATAC	GCTCCCCTCC	ACGGTGATGC	ACCACCCTGC
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	516	TCACAAGAGC	CTCAAAGCCG	CCTACTCATT	CTACAACATC	CACACAGAGA
2.3_SP6R	441	TCACAAGAGC	CTCAAAGCCG	CCTACTCATT	CTACAACATC	CACACAGAGA
NMT2	1288	TCACAAGAGC	CTCAAAGCCG	CCTACTCATT	CTACAACATC	CACACAGAGA
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	566	CGCCCCCTGCT	GGACCTCATG	AGCGACGCGC	TCATCCTGGC	TAAATCGAAA
2.3_SP6R	491	CGCCCCCTGCT	GGACCTCATG	AGCGACGCGC	TCATCCTGGC	TAAATCGAAA
NMT2	1338	CGCCCCCTGCT	GGACCTCATG	AGCGACGCGC	TCATCCTGGC	TAAATCGAAA
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	616	GGATTTGATG	TATTCAATGC	ACTGGATTTG	ATGGAAAATA	AGACATTCTT
2.3_SP6R	541	GGATTTGATG	TATTCAATGC	ACTGGATTTG	ATGGAAAATA	AGACATTCTT
NMT2	1388	GGATTTGATG	TATTCAATGC	ACTGGATTTG	ATGGAAAATA	AGACATTCTT
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	666	GGAAAAAATC	AAGTTTGGTA	TAGGAGATGG	CAATTTGCAG	TATTACCTGT
2.3_SP6R	591	GGAAAAAATC	AAGTTTGGTA	TAGGAGATGG	CAATTTGCAG	TATTACCTGT
NMT2	1438	GGAAAAAATC	AAGTTTGGTA	TAGGAGATGG	CAATTTGCAG	TATTACCTGT
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	716	ACAATTGGAG	GTGTCCAGGT	ACAGATTCTG	AAAAGGTTGG	ACTAGTACTA
2.3_SP6R	641	ACAATTGGAG	GTGTCCAGGT	ACAGATTCTG	AAAAGGTTGG	ACTAGTACTA
NMT2	1488	ACAATTGGAG	GTGTCCAGGT	ACAGATTCTG	AAAAGGTTGG	ACTAGTACTA
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	766	CAATAGATGG	ATATTTTAT	TTCTAGAACT	CTGACATCAT	CATTTGGTAA
2.3_SP6R	691	CAATAGATGG	ATATTTTAT	TTCTAGAACT	CTGACATCAT	CATTTGGTAA
NMT2	1538	CAATAGATGG	ATATTTTAT	TTCTAGAACT	CTGACATCAT	CATTTGGTAA
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	816	TATTTAACc-	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	741	TATTTAACGA	TTTCTGGAAC	tgccaatcac	tagtgaattc	gcggccgcct
NMT2	1588	TATTTAATGA	TTTCTGGAAC	tgccattcca	aagaagaata	aaagcacaac
2.3_T7F	1015	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_NMT2SI	825	-----	-----	-----	-----	-----
2.3_SP6R	791	gcaggtcgac	catatgggag	agctcccaac	gc-----	-----
NMT2	1638	tcaagtgaac	ttgaagtagt	cgataatcag	aaaagatgac	aaaagtccac

FIGURE 4.4 Séquençage du clone du produit PCR de la NMT2 en entier. Les régions en jaune correspondent à la séquence du vecteur de clonage (pGEM-T easy cloning vector). Le codon d'initiation est en vert et de celui terminaison en rouge. Les amorces utilisées pour le séquençage sont T7, SP6 et une amorce interne qui correspond au 20 premiers nucléotides de la séquence 2.3_NMT2SI.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

5.1 Récapitulation des résultats pour les phospholipases A₂

Les deux objectifs de recherche fixés au départ pour cette première partie de mon projet de maîtrise n'ont pas complètement été atteints. Le premier objectif, la purification des phospholipases A₂ sécrétées par les cellules d'EPR en culture, n'a pas été mené à terme. Le but visé par cette approche était de faire séquencer la protéine dans le dessein de construire des amorces PCR dégénérées à partir de la séquence protéique. Il est devenu inutile de poursuivre ce travail puisque l'approche du clonage utilisée en parallèle a rapporté des dividendes plus rapidement. De plus, l'approche de la purification a été ardue et infructueuse. La principale difficulté rencontrée a été la faible quantité de phospholipases disponibles dans le milieu de culture, soit le milieu de culture d'EPR récolté après 3 jours. Cependant, il était possible de détecter de façon spécifique la présence de PLA₂ dans ce milieu de culture puisque notre méthode de dosage de l'activité PLA₂ est beaucoup plus sensible que la méthode de détection des protéines sur gel SDS-PAGE. Le séquençage protéique nécessite des quantités minimales de protéines de l'ordre de 100 ng, ce que nous n'avons pas réussi à obtenir avec un minimum de pureté. L'autre problème majeur que nous avons rencontré lors de la purification est l'agrégation de ce que nous présumons être des sPLA₂. En effet, lors de l'électrophorèse des fractions contenant la plus grande activité spécifique phospholipasique, les protéines s'agrégeaient et restaient dans les puits de chargement du gel et ce, dans plusieurs tampons différents. Les bandes de protéines agrégées étaient reconnues en immunobuvardage de type Western par des anticorps dirigés contre les sPLA₂ de type IIA. Nous n'avons pas utilisé ces bandes pour le séquençage puisque même si nous supposions qu'elles contenaient des sPLA₂, elles pouvaient contenir d'autres protéines qui se seraient agrégées en même temps. Nous avons cependant réussi

à obtenir, dans des conditions dénaturantes (urée 7M), une bande au poids moléculaire recherché qui a été reconnue par les anticorps. Cependant, lors du séquençage, il a été déterminé que les protéines de cette bande étaient bloquées en N-terminal et ce, probablement à cause d'une modification post-traductionnelle courante chez les protéines eukaryotes (groupements acétyles, pyroglutamates, formyles, etc.).

La deuxième approche, soit le criblage par RT-PCR des séquences codantes pour les diverses sPLA₂ que contient l'EPR et la rétine, s'est révélée plus fructueuse que la purification. Après avoir utilisé des amorces synthétisées à partir de séquences consensus des sPLA₂ humaines, ce qui n'a pas fonctionné dû à un mauvais design ou à des conditions trop stringentes pour des amorces de ce type, nous avons fait synthétiser des amorces spécifiques à chaque type de sPLA₂ en utilisant les différentes séquences nucléotidiques des sPLA₂ publiées dans la banque du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cette approche nous a permis de déterminer quels transcrits de sPLA₂ étaient exprimés par les cellules d'EPR. Les résultats d'amplification par RT-PCR ont montré la présence de transcrits de sPLA₂ du groupe IIA de même que du groupe V. Cependant, nous avons réussi à amplifier seulement la partie C-terminale du groupe IIA même en utilisant des amorces internes dans la région N-terminale. Ces résultats suggèrent donc que la partie du transcrit codant pour la région C-terminale (au-delà du site catalytique) de cette protéine exprimée par l'EPR est différente de celle déjà caractérisée pour le groupe IIA et correspond à une nouvelle isoforme possiblement exprimée uniquement dans l'EPR.

Les résultats de Van Themsche *et al.* [169] lors de la chromatographie du cytosol de cellules d'EPR en culture sur résine échangeuse de cations montrent la présence de deux fractions d'élution qui possèdent une activité PLA₂. Or, les essais biochimiques

effectués sur ces fractions suggèrent que ces PLA₂ possèdent un site catalytique similaire aux sPLA₂ ainsi que des ponts disulfures puisqu'elles sont inhibées par l'ajout de *p*BPB et de DTT (voir Tableau 5.1). Des résultats similaires ont été obtenus par Jacob *et al.* [167] lors de la purification de PLA₂ des cellules d'EPR bovin (voir Tableau 5.1). Ces PLA₂ extraites du cytosol possédant des caractéristiques des sPLA₂ pourraient donc appartenir aux sPLA₂ du groupe V puisqu'il a été rapporté dans la littérature que ces sPLA₂ sont souvent emmagasinées sous forme de granules intracellulaires [179, 180]. Les résultats de Jacob *et al.* [167] et Van Themsche *et al.* [169] seraient ainsi cohérents avec les nôtres qui démontrent la présence de sPLA₂ des groupes IIA et V dans les cellules d'EPR.

La confirmation de la présence de plusieurs groupes de sPLA₂ dans l'EPR vient renforcer l'hypothèse qu'elles pourraient être impliquées dans le processus de phagocytose des SEP. En effet, la présence d'une isoforme du groupe IIA possiblement présente uniquement dans l'EPR impliquerait qu'elle possède un rôle spécifique dans ce tissu. On ne peut cependant pas affirmer que ce rôle soit en relation avec la phagocytose mais certains éléments nous portent à le croire. Premièrement, le groupe de Boesze-Battaglia [181] a démontré que la fusion entre des membranes des segments externes de bâtonnets et des vésicules lipidiques était grandement augmentée en présence de sPLA₂ du groupe IIA. Deuxièmement, les sPLA₂, en plus de leur fonction d'hydrolyse des phospholipides, possèdent la capacité de lier certains récepteurs de façon plus ou moins spécifique (pour une revue, voir [182]). C'est le cas des récepteurs mannose qui sont présents à la surface des cellules d'EPR et dont l'implication dans la phagocytose des SEP a été démontrée [183]. Les récepteurs mannose sont de la même famille que les récepteurs spécifiques aux sPLA₂ qu'on appelle récepteurs de type M et qui ont plutôt

TABLEAU 5.1 Comparaison entre les propriétés biochimiques des sPLA₂, cPLA₂, iPLA₂ et les PLA₂ des cellules d'EPR humain et bovin (tiré de [169])

	<i>p</i> BPB	Ca ²⁺ /EGTA	DTT	Chaleur	H ₂ SO ₄
sPLA ₂	+	+ (mM)	-/+ *	-	-
cPLA ₂	-	+ (μM)	-	+	+
iPLA ₂	-	-	-	+	n.a.
c47-49 ¶	+	+	+	+	+
c60 ¶	+	+	+	-	+
m19-20 ¶	+	+	+	-	-
RPE-1 ‡	+	+	-	-	+
RPE-10 ‡	+	+	+	-	+

* Le groupe I des sPLA₂ n'est pas sensible au DTT alors que le groupe II est sensible au DTT.

¶ Les fractions c47-49 et c60 ont été purifiées à partir du cytosol de l'EPR humain en culture et devraient présument contenir des cPLA₂ alors que la fraction m19-20 provient du milieu de culture et devrait contenir uniquement des sPLA₂ (tiré de [169]).

‡ Les fractions RPE-1 et RPE-10 ont été purifiées à partir du cytosol de l'EPR bovin fraîchement disséqué (tiré de [167]).

une fonction d'internalisation. La région liant ces récepteurs se situe dans la partie du transcrit de la sPLA₂ du groupe IIA que nous n'avons pas amplifiée, ce qui permet de supposer que cette région est différente de celle de la sPLA₂ du groupe IIA connue. Cette région pourrait être beaucoup plus spécifique envers les récepteurs mannose ou pourrait simplement être glycosylée, ce qui lui permettrait d'être reconnue par ces récepteurs. Récemment, un groupe de chercheurs a isolé des isoformes de récepteurs M qui sont spécifiques à certains tissus chez le porc [184]. La présence d'un récepteur M spécifique à la rétine qui reconnaîtrait uniquement la sPLA₂ de type IIA est donc possible.

5.2 Perspectives de recherche pour les sPLA₂

La présence possible d'une nouvelle sPLA₂ spécifique à l'EPR ouvre une multitude d'avenues de recherche. Premièrement, des expériences de transfert Northern devront être effectuées afin de connaître la taille exacte du transcrit de la sPLA₂ du groupe IIA et ainsi corroborer les résultats obtenus en immunobuvardage de type Western obtenus par Van Themsche *et al.* [169]. Deuxièmement, nous devons nous assurer de la spécificité de l'expression de ces sPLA₂ en effectuant des immunobuvardages de type Western avec différents types cellulaires. Nous devons aussi procéder à l'immunohistochimie de coupes d'yeux, ce qui nous permettra de déterminer la localisation de ces sPLA₂ dans les tissus oculaires. Troisièmement, il importe de cloner la séquence nucléotidique complète de cette protéine afin de pouvoir la surexprimer. Nous avons la possibilité d'utiliser deux approches pour atteindre cet objectif. L'amplification rapide de l'extrémité complémentaire en 3' (RACE PCR 3') permet, en principe, d'amplifier la séquence en 3' (C-terminal) par RT-PCR lorsque la séquence

en 5' est connue. Si cette approche échoue, nous criblerons une banque d'ADNc d'EPR humain que nous possédons. Une fois la séquence nucléotidique clonée, nous pourrions la surexprimer et effectuer une caractérisation plus poussée de ses propriétés biochimiques, comme sa spécificité envers différents phospholipides et son affinité pour les récepteurs mannose et de type M. La présence de récepteurs spécifiques aux tissus oculaires et apparentés aux récepteurs mannose pourra aussi être investiguée par criblage RT-PCR.

L'implication des sPLA₂ dans la phagocytose des SEP est un sujet très intéressant à approfondir puisque le phénomène de phagocytose des SEP n'est pas encore complètement élucidé. Diverses méthodes nous permettraient de mesurer le rôle joué par les sPLA₂ dans ce phénomène. Nous pouvons d'abord mentionner qu'il existe déjà des méthodes qui ont été mises au point et qui permettent de quantifier la phagocytose des cellules d'EPR, soit par cytométrie de flux [185] ou plus simplement par incorporation de molécules fluorescente dans les phagosomes [186]. Nous pourrions, dans un premier temps, ajouter de façon exogène des sPLA₂ ou transfecter des cellules d'EPR en culture mises en contact avec des SEP avec l'ADNc des sPLA₂ de type IIA ou du type V et mesurer la phagocytose des SEP par l'EPR en faisant varier les quantités de sPLA₂ recombinante dans le milieu de culture. De façon opposée, la suppression complète de l'expression de ces sPLA₂, avec des ARN ou des oligonucléotides antisens, pourrait aussi nous donner des informations pertinentes quant à l'implication des sPLA₂ dans le processus de phagocytose. Finalement l'utilisation d'anticorps pour « bloquer » l'accès des sPLA₂ à leur substrat ou à leur récepteurs. Cette technique est par contre plus aléatoire et n'empêche pas la production de protéines.

L'hypothèse d'une implication de ces PLA₂ dans la phagocytose des photorécepteurs permet de supposer qu'une mutation ou expression aberrante de cette protéine pourrait mener à une dégénérescence des photorécepteurs. C'est pourquoi nous rechercherons, avec l'aide du Dr Christian Hamel de l'unité INSERM 254 à Montpellier (France), des mutations dans les gènes de ces protéines chez des patients souffrant de dégénérescence des photorécepteurs pour déterminer si ces enzymes sont impliquées dans certaines de ces pathologies.

5.3 Récapitulation des résultats pour les NMT

Notre hypothèse de départ étant que les NMT de la rétine pourraient être différentes de celles qui sont connues. Nous avons donc cherché des parties de la séquence des NMT connues qui étaient très conservées chez plusieurs organismes, des levures jusqu'aux mammifères. On peut voir ces résultats d'amplification RT-PCR à la Figure 4.1 où l'on constate que la NMT1 et la NMT2 sont présentes autant dans la rétine que dans l'EPR. Les produits PCR ont approximativement 650 et 900 paires de base, soit la taille attendue avec les amorces utilisées. Une fois le clonage et le séquençage de ces fragments PCR effectués, les séquences se sont avérées identiques à celles des NMT1 et NMT2 humaines.

Une fois la confirmation que les NMT présentes dans la rétine étaient identiques aux NMT humaines connues, nous avons fait synthétiser des amorces afin d'amplifier les séquences codantes complètes des deux types de NMT. La taille des fragments obtenus sur gel est plus grande que la taille prévue pour la NMT1 puisque nous avons dû élargir la zone d'amplification dû à la présence d'une région GC riche en N-terminal. Le séquençage a confirmé que la séquence amplifiée ne comporte pas d'erreur et qu'un

cadre de lecture de 1488 paires de bases qui code pour les 496 acides aminés de NMT1 était présent. L'insert de NMT2 possède un cadre de lecture de 1494 paires de bases qui code pour ses 498 acides aminés.

La démonstration de la présence de NMT dans la rétine est importante puisque plusieurs protéines impliquées dans la phototransduction sont N-myristoylées ou, plus exactement, N-acylées de façon hétérogène, un phénomène unique aux photorécepteurs. L'objectif de cette étude était de déterminer si les NMT de la rétine étaient différentes des NMT déjà connues. Les résultats obtenus montrent qu'il s'agit des mêmes protéines. Par contre, les amorces que nous avons utilisées ne peuvent pas amplifier spécifiquement les trois isotypes de NMT1. On peut donc se demander si la proportion entre les trois isotypes de NMT1 et NMT2 exprimées par la rétine est la même que dans les autres tissus qui ont été étudiés jusqu'à présent. On sait maintenant que l'hétéroacylation des protéines rétinienne n'est pas due à un changement dans les proportions d'acyles-CoA disponibles dans la rétine puisque le groupe d'Anderson [159, 187] a démontré que les « pools » d'acyles-CoA sont sensiblement les mêmes dans la rétine que dans le foie et le cœur chez le bovin. Les causes de l'hétéroacylation des protéines rétinienne demeurent toutefois toujours un mystère mais elles ne sont sûrement pas étrangères à la composition lipidique particulière des photorécepteurs.

5.4 Perspectives de recherches pour les NMT

Il est difficile de déterminer quelle est la cause de l'hétéroacylation des protéines de la rétine puisque *in vitro* ou dans la production de protéines acylées recombinantes dans des systèmes procaryotes, cette acylation est dépendante des acyles-CoA fournis au

système. Est-ce que cette hétéroacylation est due à des phénomènes biochimiques spécifiques aux tissus oculaires et/ou à la composition lipidique unique de la rétine? Il n'existe toujours pas de réponse à cette question. Cependant, il existe un certain nombre de pistes qu'il faudrait étudier pour élucider cette question.

Dans un premier temps, il faudrait confirmer la présence des NMT dans la rétine à l'aide de technique de détection de protéines comme l'immunobuvardage de type Western et l'immunohistochimie. Dans deuxième temps, il serait intéressant de déterminer quel isotype de NMT1 est exprimé par la rétine et de quantifier leur proportion. Le groupe d'Anderson vient tout juste de publier une étude fonctionnelle sur l'acylation de peptides par différentes isoformes de NMT1 et NMT2 [188]. Cette étude montre les différentes affinités des isoformes de NMT envers certains acyl-CoA. Par contre, ils n'ont pas mesuré l'affinité de la NMT1 moyenne. De plus, les substrats d'acylation utilisés, soit des peptides correspondant à la séquence N-terminale des protéines CDK et Src ne sont pas représentatifs des protéines hétéroacylées de la rétine. Pour déterminer si les NMT sont responsables de l'hétéroacylation de protéines rétiniennes nous devrions déterminer l'affinité de toutes les isoformes de NMT1 ainsi que la NMT2 sur des protéines étant reconnues comme étant hétéroacylées dans la rétine.

La mise au point de systèmes de co-expression de ces différentes isoformes avec des protéines des photorécepteurs est aussi une avenue de recherche intéressante. Cela nous permettrait d'étudier les interactions protéines-lipides des protéines impliquées dans la phototransduction. Ce sujet est déjà largement étudié dans notre laboratoire avec des protéines qui sont cependant homoacylées. En surexprimant des protéines, comme la sous-unité α de la transducine et la recoverine, avec une acylation hétérogène, il serait

possible mesurer les forces d'interaction entre ces protéines et des membranes et, ainsi, en connaître plus sur le rôle de l'hétéroacylation. Notre groupe de recherche a déjà déterminé par microscopie à force atomique la force nécessaire pour extraire la recoverine myristoylée d'une membrane [189]. La présence de laurate parmi les groupement acyles des protéines des photorécepteurs est encore plus surprenante que celle du myristate puisque que son interaction avec la membrane devrait être encore plus faible que celle du myristate. La théorie la plus plausible à l'heure actuelle est que l'hétéroacylation soit un moyen de s'adapter rapidement à un changement dans le signal lumineux.

CHAPITRE 6

BIBLIOGRAPHIE

1. Ali, M. A. and Klyne, M. A., "La vision chez les vertébrés.", Décarie Masson, Ville Mont-Royal, 266 p., (1986)
2. Spence, A. P. and Mason, E. B., "Anatomie et physiologie : une approche intégrée.", Éditions du Renouveau Inc., Montréal, (1983)
3. Olive, J., "The structural organization of mammalian retinal disk membrane.", *Int Rev Cytol* 64: 107-169 (1980)
4. Shichi, H., "Molecular biology of vision.", *Dans Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, Raven Press Ltd, New York, (1994)
5. Stryer, L. and Bourne, H. R., "G proteins: a family of signal transducers", *Annu Rev Cell Biol* 2: 391-419 (1986)
6. Doly, M. and Meyniel, G., "La transduction rétinienne", *Journal de Médecine Nucléaire et Biophysique* 13: 337-341 (1989)
7. Fisher, S. K., *et al.*, "Light and electron microscopy of vertebrate photoreceptors.", *Dans Methods in Neurosciences*, Academic Press Inc., San Diego, (1993)
8. Krebs, W. and Kuhn, H., "Structure of isolated bovine rod outer segment membranes", *Exp Eye Res* 25: 511-26. (1977)

9. Amis, E. J., *et al.*, "Photopigment content of isolated bovine disk membrane vesicles", *Anal Biochem* 114: 85-91. (1981)
10. Fisher, S. K., *et al.*, "Light and Electron Microscopy of Vertebrate Photoreceptors.", *Dans Photoreceptor Cells*, Hargrave, P. A., Academic Press, San Diego, 3-36 (1993)
11. Helmreich, E. J. and Hofmann, K. P., "Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer", *Biochim Biophys Acta* 1286: 285-322. (1996)
12. Salesse, C., *et al.*, "An evaluation of purity criteria for bovine rod outer segment membranes", *Anal Biochem* 142: 258-66. (1984)
13. van Kuijk, F. J. and Dratz, E. A., "Detection of phospholipid peroxides in biological samples", *Free Radic Biol Med* 3: 349-54 (1987)
14. Winkler, B. S., *et al.*, "Oxidative damage and age-related macular degeneration", *Mol Vis* 5: 32. (1999)
15. Sevanian, A., *et al.*, "Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation", *Biochim Biophys Acta* 961: 316-27. (1988)

16. Wratten, M. L., *et al.*, "DPH lifetime distributions in vesicles containing phospholipid hydroperoxides", *Biochem Biophys Res Commun* 164: 169-75. (1989)
17. Coolbear, K. P. and Keough, K. M., "Lipid oxidation and gel to liquid-crystalline transition temperatures of synthetic polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines", *Biochim Biophys Acta* 732: 531-40. (1983)
18. Hogberg, J., *et al.*, "Lipid peroxidation of rat-liver microsomes. Its effect on the microsomal membrane and some membrane-bound microsomal enzymes", *Eur J Biochem* 37: 51-9. (1973)
19. Bartosz, G., *et al.*, "Effect of hyperoxide radicals on bovine-erythrocyte membrane", *Eur J Biochem* 73: 261-4. (1977)
20. Molday, R. S., "Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. The Friedenwald Lecture", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2491-513. (1998)
21. Salesse, C., *et al.*, "Lipid contamination of disks depends on rod outer-segment purity", *Exp Eye Res* 46: 285-7. (1988)
22. Young, R. W. and Bok, D., "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process", *J Cell Biol* 42: 392-403. (1969)

23. Bazan, N. G., *et al.*, "Neurobiology of essential fatty acids.", Plenum Press, New York, (1992)
24. Hogan, M. J., *et al.*, "Histology of the human eye.", Saunders, Philadelphia, (1971)
25. Marmor, M. F., "Structure, fonction, and disease of the retinal pigment epithelium.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F. and Wolfensberger, T. J., Oxford University Press, New York, 3-9 (1998)
26. Burnside, B. and Bost-Usinger, L., "The retinal pigment epithelial cytoskeleton.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F. and Wolfensberger, T. J., New York, 41-67 (1998)
27. Zinn, K. M. and Benjamin-Henkind, J. V., "Anatomy of the retinal pigment epithelium.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Harvard University Press, Cambridge, (1979)
28. Korte, G. E., *et al.*, "Regeneration of mammalian retinal pigment epithelium", *Int Rev Cytol* 152: 223-63 (1994)
29. Sarna, T., "Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view", *J Photochem Photobiol B* 12: 215-58. (1992)
30. Ostrovsky, M. A., *et al.*, "An antioxidative role of ocular screening pigments", *Vision Res* 27: 893-9 (1987)

31. Boulton, M., "Melanin and the retinal pigment epithelium.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F. and Wolfensberger, T. J., New York, 68-85 (1998)
32. Hudspeth, A. J. and Yee, A. G., "The intercellular junctional complexes of retinal pigment epithelia", *Invest Ophthalmol* 12: 354-65. (1973)
33. Saari, J. C., "Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 337-48 (2000)
34. Matsumoto, B., *et al.*, "Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium", *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 230: 339-54. (1987)
35. Feeney, L., "The phagolysosomal system of the pigment epithelium. A key to retinal disease", *Invest Ophthalmol* 12: 635-8. (1973)
36. Besharse, J. C. and Defoe, D. M., "Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover.", *Dans The Retinal Pigment Epithelium*, Marmor, M. F. and Wolfensberger, New York, 152-172 (1998)
37. Ferris, F. L., 3rd, *et al.*, "Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy", *Arch Ophthalmol* 102: 1640-2. (1984)

38. Leibowitz, H. M., *et al.*, "The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975", *Surv Ophthalmol* 24: 335-610. (1980)

39. Starr, C. E., *et al.*, "Age-related macular degeneration. Can we stem this worldwide public health crisis?", *Postgrad Med* 103: 153-6, 161-4. (1998)

40. Vingerling, J. R., *et al.*, "Epidemiology of age-related maculopathy", *Epidemiol Rev* 17: 347-60 (1995)

41. Friedman, A. H., *et al.*, "Senile macular degeneration: clinical, histopathological, and ultrastructural studies", *Mt Sinai J Med* 47: 227-45. (1980)

42. Strahlman, E. R., *et al.*, "The second eye of patients with senile macular degeneration", *Arch Ophthalmol* 101: 1191-3. (1983)

43. Seddon, J. M., *et al.*, "Familial aggregation of age-related maculopathy", *Am J Ophthalmol* 123: 199-206. (1997)

44. Meyers, S. M., *et al.*, "A twin study of age-related macular degeneration", *Am J Ophthalmol* 120: 757-66. (1995)

45. Pauleikhoff, D., *et al.*, "Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study", *Ophthalmology* 97: 171-8. (1990)

46. Zarbin, M. A., "Age-related macular degeneration: review of pathogenesis", *Eur J Ophthalmol* 8: 199-206. (1998)
47. Pauleikhoff, D., *et al.*, "Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane", *Ophthalmology* 99: 1548-53. (1992)
48. Pauleikhoff, D., *et al.*, "[Biochemical and histochemical analysis of age related lipid deposits in Bruch's membrane]", *Ophthalmologie* 91: 730-4. (1994)
49. Sarks, J. P., *et al.*, "Evolution of soft drusen in age-related macular degeneration", *Eye* 8: 269-83. (1994)
50. Garner, A., *et al.*, "Degenerative and other disorders of the retina and choroid.", *Dans Pathobiology of ocular disease : a dynamic approach*, Marcel Dekker, New York, (1994)
51. Green, W. R., *et al.*, "Pathologic features of senile macular degeneration", *Ophthalmology* 92: 615-27. (1985)
52. van der Schaft, T. L., *et al.*, "Element analysis of the early stages of age-related macular degeneration", *Arch Ophthalmol* 110: 389-94. (1992)
53. Eagle, R. C., Jr., "Mechanisms of maculopathy", *Ophthalmology* 91: 613-25. (1984)

54. van den Bosch, H., "Intracellular phospholipases A", *Biochim Biophys Acta* 604: 191-246. (1980)
55. Stephens, W. W., *et al.*, "The action of cobra poison on the blood : a contribution to the study of passive immunity.", *J. Pathol. Bacteriol.* 5: 279-301 (1898)
56. Fairbairn, D., *J Biol Chem* 157: 633-644 (1945)
57. Wittcoff, H., "The phosphatides.", Reinholds Publishing Corp., New York, (1951)
58. Six, D. A. and Dennis, E. A., "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization", *Biochim Biophys Acta* 1488: 1-19. (2000)
59. Gijon, M. A. and Leslie, C. C., "Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation", *J Leukoc Biol* 65: 330-6. (1999)
60. Berk, P. D. and Stump, D. D., "Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids", *Mol Cell Biochem* 192: 17-31. (1999)
61. Bingham, C. O., 3rd and Austen, K. F., "Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation", *Proc Assoc Am Physicians* 111: 516-24 (1999)

62. Austin, S. C. and Funk, C. D., "Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions", *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 58: 231-52. (1999)
63. Devillier, P., *et al.*, "Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma", *Pharmacol Res* 40: 3-13. (1999)
64. Nalefski, E. A., *et al.*, "C2 domains from different Ca²⁺ signaling pathways display functional and mechanistic diversity", *Biochemistry* 40: 3089-100. (2001)
65. Masamune, A., *et al.*, "Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells", *Pancreas* 22: 75-83. (2001)
66. Sheridan, A. M., *et al.*, "PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production", *Mol Cell Biol* 21: 4470-81. (2001)
67. Moolenaar, W. H., *et al.*, "Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses", *Curr Opin Cell Biol* 9: 168-73. (1997)
68. Balsinde, J., *et al.*, "Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages", *J Biol Chem* 272: 29317-21. (1997)

69. Dennis, E. A., "Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2", *J Biol Chem* 269: 13057-60. (1994)
70. Bicher, H. I., *et al.*, "Isolation of three different neurotoxins from Indian cobra (*Naja naja*) venom and the relation of their action to phospholipase A", *Biochem Pharmacol* 14: 1779-84. (1965)
71. Ho, I. C., *et al.*, "A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells", *J Biol Chem* 276: 18321-6. (2001)
72. Tjoelker, L. W., *et al.*, "Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad", *J Biol Chem* 270: 25481-7. (1995)
73. Dessen, A., *et al.*, "Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism", *Cell* 97: 349-60. (1999)
74. Sharp, J. D., *et al.*, "Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 269: 23250-4. (1994)
75. Reynolds, L. J., *et al.*, "Metal ion and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2", *Biochim Biophys Acta* 1167: 272-80 (1993)

76. Pickard, R. T., *et al.*, "Identification of essential residues for the catalytic function of 85- kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine", *J Biol Chem* 271: 19225-31. (1996)
77. Clark, J. D., *et al.*, "Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937", *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7708-12 (1990)
78. Nalefski, E. A., *et al.*, "Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain", *J Biol Chem* 269: 18239-49. (1994)
79. Clark, J. D., *et al.*, "A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)- dependent translocation domain with homology to PKC and GAP", *Cell* 65: 1043-51. (1991)
80. Perisic, O., *et al.*, "Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 273: 1596-604. (1998)
81. Channon, J. Y. and Leslie, C. C., "A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl- hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7", *J Biol Chem* 265: 5409-13. (1990)

82. Gijon, M. A., *et al.*, "Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2", *J Cell Biol* 145: 1219-32. (1999)
83. Murakami, M., *et al.*, "Detection of three distinct phospholipases A2 in cultured mast cells", *J Biochem (Tokyo)* 111: 175-81. (1992)
84. Diez, E., *et al.*, "Substrate specificities and properties of human phospholipases A2 in a mixed vesicle model", *J Biol Chem* 267: 18342-8. (1992)
85. Lin, L. L., *et al.*, "cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase", *Cell* 72: 269-78. (1993)
86. Mosior, M., *et al.*, "Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity", *J Biol Chem* 273: 2184-91. (1998)
87. Tamiya-Koizumi, K., *et al.*, "A novel phospholipase A2 associated with nuclear matrix: stimulation of the activity and modulation of the Ca²⁺ dependency by polyphosphoinositides", *Biochim Biophys Acta* 1002: 182-8. (1989)
88. Balsinde, J., *et al.*, "Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol bisphosphate levels", *J Immunol* 164: 5398-402. (2000)

89. Leslie, C. C. and Channon, J. Y., "Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity", *Biochim Biophys Acta* 1045: 261-70. (1990)
90. Pickard, R. T., *et al.*, "Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 274: 8823-31. (1999)
91. Song, C., *et al.*, "Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta", *J Biol Chem* 274: 17063-7. (1999)
92. Underwood, K. W., *et al.*, "A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2", *J Biol Chem* 273: 21926-32 (1998)
93. Ackermann, E. J., *et al.*, "Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization", *J Biol Chem* 269: 9227-33. (1994)
94. Tang, J., *et al.*, "A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs", *J Biol Chem* 272: 8567-75. (1997)
95. Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J., "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework", *Trends Biochem Sci* 24: 311-6. (1999)

96. Winstead, M. V., *et al.*, "Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function", *Biochim Biophys Acta* 1488: 28-39. (2000)
97. Larsson Forsell, P. K., *et al.*, "The human calcium-independent phospholipase A2 gene multiple enzymes with distinct properties from a single gene", *Eur J Biochem* 262: 575-85 (1999)
98. Lio, Y. C. and Dennis, E. A., "Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A2", *Biochim Biophys Acta* 1392: 320-32. (1998)
99. Balsinde, J. and Dennis, E. A., "Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2", *J Biol Chem* 272: 16069-72. (1997)
100. Mancuso, D. J., *et al.*, "The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium- independent phospholipase A(2)", *J Biol Chem* 275: 9937-45. (2000)
101. Tjoelker, L. W., *et al.*, "Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase", *Nature* 374: 549-53. (1995)
102. Min, J. H., *et al.*, "Membrane-bound plasma platelet activating factor acetylhydrolase acts on substrate in the aqueous phase", *Biochemistry* 38: 12935-42. (1999)

103. Stafforini, D. M., *et al.*, "Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties", *J Biol Chem* 262: 4223-30. (1987)
104. Sevanian, A. and Kim, E., "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes", *J Free Radic Biol Med* 1: 263-71 (1985)
105. Balevska, P. S., *et al.*, "Inhibition of phospholipid hydrolysis by soluble phospholipase A2 in biological membranes of different origin after lipid peroxidation", *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 12: 58-65 (1986)
106. van Kuijk, F. J., *et al.*, "A new role for phospholipase A2 : Protection of membranes from lipid peroxidation damage", *Trends Biochem Sci* 12: 31-34 (1987)
107. Nigam, S. and Schewe, T., "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation", *Biochim Biophys Acta* 1488: 167-81. (2000)
108. Murakami, M. and Kudo, I., "Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s", *Adv Immunol* 77: 163-94 (2001)
109. Apitz-Castro, R. J., *et al.*, "Isolation of homogeneous phospholipase A2 from human platelets", *Biochem Biophys Res Commun* 91: 63-71. (1979)
110. Kozumplik, V., *et al.*, "Purification of pancreatic phospholipase A2 from human duodenal juice", *Biochim Biophys Acta* 1002: 395-7. (1989)

111. Zhu, H., *et al.*, "Phospholipase A2 engineering. The roles of disulfide bonds in structure, conformational stability, and catalytic function", *Biochemistry* 34: 15307-14. (1995)
112. Janssen, M. J., *et al.*, "Engineering the disulphide bond patterns of secretory phospholipases A2 into porcine pancreatic isozyme. The effects on folding, stability and enzymatic properties", *Eur J Biochem* 261: 197-207 (1999)
113. Pernas, P., *et al.*, "Phospholipid synthesis by extracellular phospholipase A2 in organic solvents", *Biochem Biophys Res Commun* 168: 644-50. (1990)
114. Stahl, U., *et al.*, "Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A2 from developing seeds of elm", *Plant Physiol* 117: 197-205 (1998)
115. Kudo, I., *et al.*, "Mammalian non-pancreatic phospholipases A2", *Biochim Biophys Acta* 1170: 217-31. (1993)
116. Scott, D. L., *et al.*, "Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2", *Science* 250: 1541-6. (1990)
117. Wery, J. P., *et al.*, "Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Å resolution", *Nature* 352: 79-82. (1991)
118. Tischfield, J. A., "A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals", *J Biol Chem* 272: 17247-50 (1997)

119. Snitko, Y., *et al.*, "Differential interfacial and substrate binding modes of mammalian pancreatic phospholipases A₂: a comparison among human, bovine, and porcine enzymes", *Biochemistry* 38: 7803-10. (1999)
120. Tojo, H., *et al.*, "A phospholipase A₂ in the supernatant fraction of rat spleen. Its similarity to rat pancreatic phospholipase A₂", *J Biol Chem* 263: 5724-31. (1988)
121. Sakata, T., *et al.*, "Presence of pancreatic-type phospholipase A₂ mRNA in rat gastric mucosa and lung", *Biochim Biophys Acta* 1007: 124-6. (1989)
122. Kortesus, P. T., *et al.*, "Rat pancreatic phospholipase A₂. Purification, localization, and development of an enzyme immunoassay", *Int J Pancreatol* 13: 111-8. (1993)
123. Valentin, E., *et al.*, "On the diversity of secreted phospholipases A₂. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes", *J Biol Chem* 274: 31195-202. (1999)
124. Kinkaid, A. R. and Wilton, D. C., "Enhanced hydrolysis of phosphatidylcholine by human group II non- pancreatic secreted phospholipase A₂ as a result of interfacial activation by specific anions. Potential role of cholesterol sulphate", *Biochem J* 308: 507-12. (1995)

125. Nevalainen, T. J., *et al.*, "Pancreatic and synovial type phospholipases A2 in serum samples from patients with severe acute pancreatitis", *Gut* 34: 1133-6. (1993)
126. Laurin, M. A., *et al.*, "Cloning of the phospholipases A2 expressed by the human retinal pigment epithelium", *Invest Ophthalmol Vis Sci* Soumis (2002)
127. Saari, K. M., *et al.*, "Group II PLA(2) content of tears in normal subjects", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 318-20. (2001)
128. Buckland, A. G. and Wilton, D. C., "The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2)", *Biochim Biophys Acta* 1488: 71-82. (2000)
129. Kuwata, H., *et al.*, "Role of type IIA secretory phospholipase A2 in arachidonic acid metabolism", *Adv Exp Med Biol* 469: 183-8 (1999)
130. Murakami, M., *et al.*, "Regulatory functions of phospholipase A2", *Crit Rev Immunol* 17: 225-83 (1997)
131. Bidgood, M. J., *et al.*, "Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes", *J Immunol* 165: 2790-7. (2000)
132. Hernandez, M., *et al.*, "Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1", *J Biol Chem* 273: 606-12 (1998)

133. Hernandez, M., *et al.*, "Secretory phospholipase A2 induces phospholipase Cgamma-1 activation and Ca²⁺ mobilization in the human astrocytoma cell line 1321N1 by a mechanism independent of its catalytic activity", *Biochem Biophys Res Commun* 260: 99-104 (1999)
134. Hara, S., *et al.*, "Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis", *J Biochem (Tokyo)* 105: 395-9 (1989)
135. Valentin, E., *et al.*, "Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme", *J Biol Chem* 275: 7492-6. (2000)
136. Chen, J., *et al.*, "Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A2", *Biochim Biophys Acta* 1215: 115-20. (1994)
137. Chen, J., *et al.*, "Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2", *J Biol Chem* 269: 2365-8. (1994)
138. Murakami, M., *et al.*, "The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2", *J Biol Chem* 273: 14411-23. (1998)

139. Murakami, M., *et al.*, "Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation", *J Biol Chem* 274: 31435-44. (1999)
140. Balboa, M. A., *et al.*, "Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages", *J Biol Chem* 271: 32381-4. (1996)
141. Balsinde, J., *et al.*, "Identification of a third pathway for arachidonic acid mobilization and prostaglandin production in activated P388D1 macrophage-like cells", *J Biol Chem* 275: 22544-9. (2000)
142. Balsinde, J., *et al.*, "Group V phospholipase A(2)-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D(1) macrophages", *J Biol Chem* 275: 4783-6. (2000)
143. Cupillard, L., *et al.*, "Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2", *J Biol Chem* 272: 15745-52 (1997)
144. Hanasaki, K., *et al.*, "Purified group X secretory phospholipase A(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells", *J Biol Chem* 274: 34203-11. (1999)

145. Grand, R. J., "Acylation of viral and eukaryotic proteins", *Biochem J* 258: 625-38. (1989)
146. Bhatnagar, A. and Gordon, J. I., "Understanding covalent modification of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle.", *Trends Cell Biol* 7: 14-20 (1998)
147. Casey, P. J., "Protein lipidation in cell signaling", *Science* 268: 221-5. (1995)
148. Chow, M., *et al.*, "Structure and biological effects of lipid modifications on proteins", *Curr Opin Cell Biol* 4: 629-36. (1992)
149. Towler, D. A., *et al.*, "The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation", *Annu Rev Biochem* 57: 69-99 (1988)
150. O'Brien, P. J., *et al.*, "Acylation of disc membrane rhodopsin may be nonenzymatic", *J Biol Chem* 262: 5210-5. (1987)
151. Resh, M. D., "Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins", *Biochim Biophys Acta* 1451: 1-16. (1999)
152. Towler, D. A., *et al.*, "Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase", *J Biol Chem* 262: 1030-6. (1987)

153. Towler, D. A., *et al.*, "Purification and characterization of yeast myristoyl CoA:protein N- myristoyltransferase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2708-12. (1987)
154. Duronio, R. J., *et al.*, "Mutations of human myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase cause temperature-sensitive myristic acid auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4129-33. (1992)
155. Raju, R. V., *et al.*, "Genomic organization of human myristoyl-CoA:protein N- myristoyltransferase-1", *Biochem Biophys Res Commun* 257: 284-8. (1999)
156. McIlhinney, R. A., *et al.*, "Characterization of human and rat brain myristoyl-CoA:protein N- myristoyltransferase: evidence for an alternative splice variant of the enzyme", *Biochem J* 333: 491-5. (1998)
157. Giang, D. K. and Cravatt, B. F., "A second mammalian N-myristoyltransferase", *J Biol Chem* 273: 6595-8. (1998)
158. Bhatnagar, R. S., *et al.*, "Structure of N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs", *Nat Struct Biol* 5: 1091-7. (1998)
159. DeMar, J. C., Jr., *et al.*, "Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins", *Prog Lipid Res* 38: 49-90. (1999)

160. Wilcox, C., *et al.*, "Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally", *Science* 238: 1275-8. (1987)

161. Kishore, N. S., *et al.*, "The substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. Analysis of myristic acid analogs containing oxygen, sulfur, double bonds, triple bonds, and/or an aromatic residue", *J Biol Chem* 266: 8835-55. (1991)

162. Rudnick, D. A., *et al.*, "Analogues of palmitoyl-CoA that are substrates for myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase", *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10507-11. (1992)

163. Neubert, T. A., *et al.*, "The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated", *J Biol Chem* 267: 18274-7. (1992)

164. Dizhoor, A. M., *et al.*, "The NH₂ terminus of retinal recoverin is acylated by a small family of fatty acids", *J Biol Chem* 267: 16033-6. (1992)

165. Johnson, R. S., *et al.*, "Heterogeneous N-acylation is a tissue- and species-specific posttranslational modification", *J Biol Chem* 269: 21067-71. (1994)

166. Jacob, M., *et al.*, "Presence of a light-independent phospholipase A₂ in bovine retina but not in rod outer segments", *J Biol Chem* 271: 19209-18 (1996)

167. Jacob, M., *et al.*, "Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipase A₂", *Biochem J* 327: 455-60 (1997)

168. Jacob, M., *et al.*, "Phospholipases A2 of rod outer segment-free bovine retinæ are different from well-known phospholipases A2", *Biochim Biophys Acta* 1391: 169-80 (1998)
169. Van Themsche, C., *et al.*, "Human retinal pigment epithelium secretes a phospholipase A2 and contains two novel intracellular phospholipases A2", *Biochem Cell Biol* 79: 1-10 (2001)
170. Bayburt, T., *et al.*, "Continuous, vesicle-based fluorimetric assays of 14- and 85-kDa phospholipases A2", *Anal Biochem* 232: 7-23 (1995)
171. Bollag, D. M., *et al.*, "Protein Methods.", Wiley-Liss Inc., New York, 415, (1996)
172. Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227: 680-5. (1970)
173. Kemparaju, K., *et al.*, "Purification and characterization of a platelet aggregation inhibitor acidic phospholipase A2 from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom", *Toxicon* 37: 1659-71. (1999)
174. Laing, G. D., *et al.*, "Characterisation of a purified phospholipase A2 from the venom of the Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*)", *Biochim Biophys Acta* 1250: 137-43. (1995)

175. Serrano, S. M., *et al.*, "A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor", *Arch Biochem Biophys* 367: 26-32 (1999)
176. Shinozaki, K. and Waite, M., "A novel phosphatidylglycerol-selective phospholipase A2 from macrophages", *Biochemistry* 38: 1669-75 (1999)
177. Gu, L., *et al.*, "Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus*", *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 104-10. (2002)
178. Fremont, D. H., *et al.*, "Crystal structure of phospholipase A2 from Indian cobra reveals a trimeric association", *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 342-6. (1993)
179. Bingham, C. O., 3rd, *et al.*, "Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells", *J Biol Chem* 274: 31476-84. (1999)
180. van der Helm, H. A., *et al.*, "Group IIA and group V secretory phospholipase A(2): quantitative analysis of expression and secretion and determination of the localization and routing in rat mesangial cells", *Biochim Biophys Acta* 1530: 86-96. (2001)
181. Boesze-Battaglia, K., "Membrane properties that influence bovine retinal ROS membrane fusion", *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 35: 2139 (1994)

182. Valentin, E. and Lambeau, G., "Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins", *Biochim Biophys Acta* 1488: 59-70. (2000)
183. Boyle, D., *et al.*, "A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1464-70 (1991)
184. Vardjan, N., *et al.*, "High-molecular-mass receptors for ammodytotoxin in pig are tissue- specific isoforms of M-type phospholipase A(2) receptor", *Biochem Biophys Res Commun* 289: 143-9. (2001)
185. Kennedy, C. J., *et al.*, "A simple flow cytometric technique to quantify rod outer segment phagocytosis in cultured retinal pigment epithelial cells", *Curr Eye Res* 15: 998-1003 (1996)
186. McLaren, M. J., *et al.*, "Double fluorescent vital assay of phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells", *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 317-26. (1993)
187. DeMar, J. C., Jr. and Anderson, R. E., "Identification and quantitation of the fatty acids composing the CoA ester pool of bovine retina, heart, and liver", *J Biol Chem* 272: 31362-8. (1997)

188. Rundle, D. R., *et al.*, "Characterization of Type I and Type II Myristoyl-CoA:protein N - Myristoyltransferases with the Acyl-CoAs found on Heterogeneously Acylated Retinal Proteins", *Exp Eye Res* 75: 87-97. (2002)
189. Desmeules, P., *et al.*, "Measurement of membrane binding between recoverin, a calcium-myristoyl switch protein, and lipid bilayers by AFM-based force spectroscopy", *Biophys. J.* sous-presse (2002)

